Puls-Cancerogenese durch das Nervensystem-spezifische Carcinogen N-Äthyl-N-Nitrosoharnstoff: Vergleichende Analyse der Äthylierung von Nucleinsäuren und Eliminationskinetik äthylierter Basen aus der DNS verschiedener Rattengewebe

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt
von

REGINE GOTH
aus Wuppertal

1974

74 331

Puls-Cancerogenese durch das Nervensystem-spezifische Carcinogen N-Äthyl-N-Nitrosoharnstoff:

Vergleichende Analyse der Äthylierung von Nucleinsäuren und Eliminationskinetik äthylierter Basen aus der DNS verschiedener Rattengewebe

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt
von

REGINE GOTH
aus Wuppertal

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 25. April 1974

Dekan: Prof. Dr. D. Sperlich

1. Berichterstatter: Priv.Doz.Dr. M.F. Rajewsky

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Seyffert

aku- Fotodruck, 86 Bamberg, Färbergasse 8 R

Herrn Dr. Manfred Rajewsky möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen für die hilfreiche Unterstützung und wohlwollende Leitung dieser Arbeit. Ihm und den Mitarbeitern des Max-Planck-Institutes für Virusforschung verdanke ich zahlreiche anregende Diskussionen und Ratschläge.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0090

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verzeichnis der Abkürzungen	1
1. Einleitung	2
1.1. Zur Theorie der Wirkungsweise chemischer Cancerogene, speziell der Nitrosamine und Nitrosamide	2
1.2. Zur biologischen Wirkung des Cancerogens N-Äthyl-N-nitrosoharnstoff	4
2. Material und Methoden	7
2.1. Chemikalien	7
2.2. Puffer und Lösungen	8
2.3. Apparate	9
2.4. Tiermaterial	
2.5. Chemische Charakterisierung von Äthyl-nitrosoharnstoff	10
2.6. Tierversuche	10
2.7. Präparation von Nucleinsäuren und Protein aus verschiedenen Geweben der foetalen, neugeborenen und adulten Ratte	13
2.8. Charakterisierung der Nucleinsäuren	16
2.9. In vitro-Äthylierung von Rattenleber-DNS durch Äthylnitrosoharnstoff -1-^{14}C	17
2.10. Hydrolyse der Nucleinsäuren	17
2.11. Chromatographie der Nucleinsäurehydrolysate	18
2.11.1. Kationenaustauschersäule	19
2.11.2. Sephadex G 10-Säule	20
2.12. Synthese von N7-Äthylguanin	21
2.13. Charakterisierung der untersuchten äthylierten Purinbasen	22
2.14. Messung der Radioaktivität	23

Seite

2.15. Berechnung des Anteils äthylierter Purinbasen in DNS oder RNS 24

2.16. Papierchromatographischer Nachweis von N7-Äthylguanin 25

2.17. Bestimmung der Stabilität der äthylierten Purinbasen in der DNS in vitro 26

3. Ergebnisse 27

3.1. Initiale Äthylierung von Nucleinsäuren durch Äthylnitrosoharnstoff 27

3.1.1. Äthylierung von Purinbasen bei der Reaktion von Rattenleber-DNS mit Äthylnitrosoharnstoff-1-^{14}C in vitro 27

3.1.1.1. Analyse durch Trennung des DNS-Hydrolysates über eine Ionenaustauschersäule 27

3.1.1.2. Analyse durch Trennung des DNS-Hydrolysates über eine Sephadex G 10-Säule 29

3.1.1.3. "Anfangspeak" 31

3.1.2. Gehalt äthylierter Purinbasen in den Nucleinsäuren verschiedener Rattengewebe 1 Std. nach Applikation von Äthylnitrosoharnstoff-1-^{14}C in vivo 32

3.1.2.1. N7-Äthylguanin in Nucleinsäuren aus foetalem und adultem Gewebe 32

3.1.2.2. Äthylpurinbasenmuster in verschiedenen Geweben 38

3.1.2.3. Äthylierungsausbeuten bei verschiedenen proliferativen Zuständen eines Gewebes 44

Seite

3.1.2.3.1. Gesteigerte DNS-Synthese in der Leber nach Teilhepatektomie 44

3.1.2.3.2. Gehemmte DNS-Synthese in der foetalen Ratte nach Applikation von Hydroxyharnstoff 46

3.2. Kinetische Betrachtung des Gehalts der Nucleinsäuren an äthylierten Purinbasen 48

3.2.1. Stabilität äthylierter Purinbasen in der DNS in vitro 48

3.2.2. Eliminierung von N7-Äthylguanin in vivo aus den Nucleinsäuren der Rattenleber nach einmaliger Applikation von N,N-Diäthyl-(1-^{14}C)-nitrosamin 50

3.2.3. Eliminationsraten verschiedener äthylierter Purinbasen in vivo aus den Nucleinsäuren von Leber und Gehirn 10 Tage alter Ratten nach Puls-Applikation von Äthylnitrosoharnstoff-1-^{14}C 55

4. Diskussion 65

4.1. Vergleich der cancerogenen und äthylierenden Eigenschaften von Äthylnitrosoharnstoff mit denen anderer alkylierender Cancerogene 65

4.2. Mögliche Determinanten für die Organspezifität der cancerogenen Wirkung von Äthylnitrosoharnstoff 73

4.2.1. Proliferative Aktivität (DNS-Replikations- und Zellteilungsrate) des Gewebes 74

4.2.2. Eliminationsgeschwindigkeit äthylierter Basen aus der DNS 76

5. Zusammenfassung 83

6. Literaturverzeichnis 85

Lebenslauf 95

Verzeichnis der Abkürzungen

ÄNH	N-Äthyl-N-nitrosoharnstoff
MNH	N-Methyl-N-nitrosoharnstoff
DÄNA	N,N-Diäthylnitrosamin
DMN	N,N-Dimethylnitrosamin
ÄMS	Äthylmethansulfonat
MMS	Methylmethansulfonat
DMS	Dimethylsulfat
MNNG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
HU	Hydroxyharnstoff
^{3}H-Tdr	Thymidin-methyl-^{3}H
A	Adenin
G	Guanin
N7-MG	N7-Methylguanin
N7-ÄG	N7-Äthylguanin
O6-MG	O6-Methylguanin
O6-ÄG	O6-Äthylguanin
N3-MG	N3-Methylguanin
N3-ÄG	N3-Äthylguanin
N1-MA	N1-Methyladenin
N7-MA	N7-Methyladenin
N7-ÄA	N7-Äthyladenin
N3-MA	N3-Methyladenin
N3-ÄA	N3-Äthyladenin
N3-MC	N3-Methylcytosin
Kgw	Körpergewicht
i.v.	intravenös
i.p.	intraperitoneal
LD_{50}	50 % der letalen Dosis
h	Stunde
$T_{1/2}$	Halbwertszeit
Cetab	Cetyltrimethylammoniumbromid
dpm	Zerfälle pro Minute

1. Einleitung

1.1. Zur Theorie der Wirkungsweise chemischer Cancerogene, speziell der Nitrosamine und Nitrosamide

Bei chemischen Cancerogenen kann man davon ausgehen, daß ihre biologische Wirkung die Folge einer Wechselwirkung mit bestimmten Zellbestandteilen sein muß. Da die maligne Transformation der Zelle offenbar eine genetisch stabile Veränderung darstellt und da chemische Cancerogene in ihrer oft erst im Organismus gebildeten reaktiven Form ("ultimate carcinogens" (78)) fast immer auch Mutagene sind (79, 101), wird ihre Wirkung häufig auf eine Reaktion mit der zellulären DNS zurückgeführt und als primäre Ursache der Krebsentstehung eine Veränderung am DNS-Molekül postuliert ("Somatische Mutationstheorie", 1914 erstmals von Boveri ausgesprochen (8), zusammenfassender Überblick siehe (41)). Eine Stütze für diese Vorstellungen bildet der Nachweis einer Reaktion von Cancerogenen mit Nucleinsäuren in den Zellen von Geweben, in denen sich in der Folge maligne Tumoren entwickeln. Als ersten gelang Magee und Farber (69) nach Anwendung des Lebercancerogens Dimethylnitrosamin an Ratten der Nachweis einer covalenten Bindung des Carcinogens (bzw. seiner in vivo entstehenden "Wirkform", eines Carboniumions) an Nucleinsäuren in Form einer Methylierung am N7 des Guanins. Inzwischen wurde für eine Vielzahl von Cancerogenen eine Reaktion mit Nucleinsäuren nachgewiesen (45).

Es sind im wesentlichen zwei Mechanismen beschrieben worden, durch welche die Alkylierung einer Nucleinsäurebase eine Mutation verursachen und damit zur malignen Transformation der Zelle führen könnte (11, 52), und zwar a) eine anomale Basenpaarung oder b) eine Deletion der alkylierten Base.

Zu a). Die durch die Alkylierung veränderten Eigenschaften der Base könnten bei der nächstfolgenden DNS-Replikation eine falsche Basenpaarung zur Folge haben. Hieraus könnte eine Veränderung der genetischen Information mit der möglichen Konsequenz einer malignen Transformation der Zelle resultieren.
Zu b). Da eine Alkylierung an einem Ringstickstoff des Purinmoleküls die N-glykosidische Bindung labilisiert (9), werden alkylierte Basen leicht aus der DNS herausgespalten. Bei Replikation der DNS könnte die Position im komplementären Strang gegenüber der Lücke entweder durch eine beliebige Base aufgefüllt werden oder eine Deletion der komplementären Base im neugebildeten Strang erfolgen. Durch eine solche Deletion würde die gesamte vom entsprechenden Gen codierte Polypeptidkette verändert, während bei einer anomalen Basenpaarung (wenn überhaupt, da degenerierter Code) nur eine Aminosäure in der Sequenz verändert wird. Deshalb wird eine solche Deletion eher als ein für die Zelle letales Ereignis angesehen und,neben den bei der Elimination alkylierter Basen auftretenden Strangbrüchen, für die toxische Wirkung eines Agens verantwortlich gemacht.
Außer einer durch falsche Basenpaarung bewirkten Änderung der genetischen Information wäre auch denkbar, daß als Folge einer Basen-Alkylierung eine Konformationsänderung der DNS eintritt, welche die Replikation ganzer Bereiche der DNS stört oder für die Genexpression verantwortliche Wechselwirkungen zwischen der DNS und regulatorischen Proteinen verändert.

Unabhängig von dem genauen Mechanismus scheint zur malignen Transformation einer Zelle eine "Fixierung" des primären "Schadens" durch nachfolgende Replikation der DNS notwendig zu sein (3, 91). Ob es zu einer solchen Fixierung kommt, ist damit abhängig von zwei wichtigen Faktoren, nämlich einmal der Fähigkeit der Zelle, einen solchen Schaden in der DNS zu erkennen und zu

reparieren, zum anderen von der proliferativen Aktivität der Zelle, d.h. von dem Zeitraum, der ihr zur Verfügung steht, um vor der nächstfolgenden DNS-Replikation die entsprechende Reparatur an der DNS durchzuführen.

Nitrosamine und Nitrosamide sind als solche nicht cancerogen, sondern werden erst im Organismus in ihre carcinogene (alkylierende) "Wirkform" ("ultimate carcinogen", 78)) umgewandelt (29). Im Falle der Nitrosamine ist eine enzymatische Aktivierung nötig. Die entsprechenden Enzyme, die eine α-Hydroxylierung bewirken, kommen hauptsächlich in der Leber vor. Nitrosamide zerfallen dagegen im neutralen und basischen Bereich heterolytisch. Das in beiden Fällen entstehende Monoalkylnitrosamin soll nach Schoenthal (94) unter Wasserabspaltung in das Diazoalkan übergehen, das dann unter Abspaltung von Stickstoff ein elektrophiles, hochreaktives Carboniumion liefert. Lijinsky (62) konnte jedoch mit perdeuteriertem Dimethylnitrosamin nachweisen, daß intermediär kein Diazoalkan gebildet wird, da das aus den Lebernucleinsäuren isolierte N7-MG kein CD_2H, sondern CD_3 enthielt. Man muß deshalb annehmen, daß das Monoalkylnitrosamin zum Alkyldiazohydroxyd tautomerisiert, das dann unter Abspaltung der Hydroxylgruppe als Vorstufe des Carboniumions (also als "proximate carcinogen",(78)) das Alkyldiazoniumion liefert. Auch in Anbetracht des neutralen pH-Bereichs im Organismus würde diese Möglichkeit sehr viel plausibler erscheinen (53).

1.2. Zur biologischen Wirkung des Cancerogens N-Äthyl-N-nitrosoharnstoff

Die mutagene Wirkung von ÄNH wurde in einer Vielzahl von Systemen nachgewiesen, so an Saccharomyces cerevisiae (73), Arabidopsis (37) und dem Coliphagen T2 (64).

Die Wirkung von ÄNH im Säugerorganismus wurde ganz besonders sorgfältig von der Arbeitsgruppe von Druckrey untersucht, und zwar hauptsächlich an Rattenstämmen der BD-Serie (27-33, 46). Als toxische Erscheinungen nach hohen ÄNH-Dosen treten bei adulten Ratten vor allem schwere Schädigungen stark proliferierender Gewebe auf, so des Knochenmarks und der lymphatischen Gewebe, außerdem Hämorrhagien und Ulcerationen im Magen-Darm-Trakt. Die LD_{50} liegt bei 240 mg/kg Kgw (46). Die homologe Methylverbindung MNH ist sehr viel toxischer (LD_{50} = 110 mg/kg Kgw; (28)).Nach transplacentarer Applikation an foetale Ratten wirkt ÄNH auch teratogen. Bei Applikation während der frühen pränatalen Entwicklung entstehen vor allem Mißbildungen des Gehirns (25), in späteren Stadien der Embryonalentwicklung Mißbildungen des Skeletts und hier vor allem der Extremitäten (27).

Als Cancerogen zeichnet sich ÄNH durch eine hohe Spezifität für das sich entwickelnde Nervensystem aus (46, 30, 31, 33). Die entstehenden Tumoren wurden von Wechsler et al. (105) als Gliome, Ependymome, Neurinome, Sarkome und Olfaktorius-Neuroepitheliome identifiziert. Bereits nach einmaliger Applikation von ÄNH an gravide Ratten entstehen bei deren Nachkommen nach einer dosisabhängigen Induktionszeit selektiv und mit hoher Ausbeute maligne Tumoren im Gehirn und im peripheren Nervensystem. Nach den bisher vorliegenden Untersuchungen scheint das foetale Nervensystem vor dem 12. Tag der embryonalen Entwicklung für die cancerogene Wirkung des ÄNH unempfindlich zu sein. Danach nimmt die Empfindlichkeit (gemessen an der zur Tumorentstehung benötigten Dosis, der Tumorausbeute und der mittleren Tumorinduktionszeit) sprunghaft zu, bleibt im Zeitraum zwischen etwa dem 18. Tag der Gravidität und der Geburt (23. Tag) ungefähr konstant (46) und fällt

danach im Verlauf des 1. Lebensmonats auf weniger als 1/10 ab (31). Während der perinatalen Periode ist die Empfindlichkeit des Nervensystems für die carcinogene Wirkung des ÄNH 50 - 100mal größer als im adulten Tier. Eine spezifisch neurogene Wirkung wurde auch bei Hamsterfoeten (46) und neugeborenen Mäusen (93) nachgewiesen. Im Vergleich zu MNH ist die carcinogene Wirkung von ÄNH in 1-10 Tage alten Tieren bei äquimolarer Dosierung um mehr als den Faktor 2 erhöht (33).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Äthylierung von Nucleinsäurebasen, vor allem der DNS, durch ÄNH in verschiedenen Geweben der foetalen, neugeborenen und adulten BD IX-Ratte vergleichend untersucht. Hierbei wurden die Fragen einer möglichen Abhängigkeit des Äthylierungsgrades und der relativen Anteile äthylierter Basen von der proliferativen Aktivität der betroffenen Gewebe sowie einer möglichen unterschiedlichen Persistenz bestimmter Äthylierungsprodukte in der DNS verschiedener Gewebe besonders berücksichtigt. Es wurde versucht, die gemessenen Parameter zur Erklärung der hohen cancerogenen Wirksamkeit von ÄNH und seiner Spezifität für das Nervensystem heranzuziehen.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Es wurde bezogen von:

Fa. Merck AG, Darmstadt:

Phenol p.a.
m-Kresol z. Synth.
8-Hydroxychinolin p.a.
Äthylenglykolmonoäthyläther z. Synth.
Toluol p.a.
Diäthylsulfat z. Synth.
Orcin, krist.
Diphenylamin p.a.
Indol p.a.

Fa. Serva, Heidelberg:

p-Aminosalicylsäure, Natriumsalz x $2H_2O$ reinst.
Dodecylsulfat, Natriumsalz, reinst
Cetyltrimethylammoniumbromid (Cetab) rein
Triton X-100, speziell gereinigt für Scintillationstechnik
Dowex Ionenaustauscher-Harz, Typ 50W X 12, 200-400 mesh
Ribonuclease, 5 x krist., reinst, aus Pankreas, frei von Protease und DNase, 45 Kunitz-E/mg

Fa. Packard Instruments, Frankfurt/Main:

PPO (2,5-Diphenyloxazol)
Insta-Gel, Emulgator für wässrige Proben

Fa. Schuchardt, München:

Naphthalin-1,5-disulfonsäure, Dinatriumsalz, techn.

Fa. Calbiochem, Los Angeles:

DNS aus Lachsspermien, Natriumsalz, hoch polymerisiert, A grade

Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

RNS aus Hefe

Fa. Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio:
Hydroxyharnstoff

Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden:
Sephadex G -10, Teilchengröße 40-120 u

Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt/Main:

N-Nitroso-N-äthylharnstoff (äthyl-1-^{14}C)

1. 105 mg, 5 mCi, 47,6 mCi/g ≙ 5,57 mCi/mMol
2. 380 mg, 20,7 mCi, 54,5 mCi/g ≙ 6,38 mCi/mMol
3. 416 mg, 20,0 mCi, 48,9 mCi/g ≙ 5,72 mCi/mMol

N,N-Diäthyl-(1-^{14}C)-nitrosamin, in 0,8%iger wäßriger Lösung 108 mg, 13,5 ml, 1,33 mCi/ml ≙ 17 mCi/mMol

Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig:

Thymidin-(methyl-^{3}H), in wäßriger Lösung, 5 Ci/mMol
NCS Solubilizer, 0,6 N Lsg. in Toluol

N3-Äthyladenin und N7-Äthyladenin wurden freundlicherweise von Herrn Dr. L. Rodriguez, Division Pharmaceutique, Union Chimique, Brüssel, zur Verfügung gestellt.

O6-Äthylguanin wurde von Herrn Dr. R. Uhmann, Institut für organische Chemie der Universität Tübingen, synthetisiert.

2.2. Puffer und Lösungen

"ÄNH-Puffer" (pH6):
632 ml 0,2 M Na_2HPO + 368 ml 0,1 M Citronensäure (76)

Zur Nucleinsäurepräparation:

0,5 % Natrium-Naphthalin-1,5-Disulfonsäure (pH 6,5):
zu je 100 ml Na-Naphthalin-1,5-Disulfonsäure-Lösung wurden 0,1 ml 2,5 MK_2HPO Puffer (pH 7,3) gegeben und mit verd. Phosphorsäure auf pH 6,5 eingestellt.

Phenol-Reagens:

1000 g Phenol + 110 ml H_2O + 140 ml m-Kresol (redest.) + 1,0 g 8-Hydroxychinolin

RNase-Lösung:

1 mg/ml in H_2O gelöst, 20 min auf 90° erhitzt, um eventuell vorhandene Desoxyribonuclease zu denaturieren.

Verd. SSC-Puffer:

0,015 N NaCl, 0,0015 N Natriumcitrat, pH 7

Toluol-Szintillator: 5 g PPO/1 Ltr Toluol

Triton X-Szintillator: 7 g PPO, 0,41 Triton X, 0,61 Toluol.

2.3. Apparate

Fraktionssammler LKB Radi-Rac, Typ 3402B + 3403B
und LKB Ultrorac Typ 7000
mit LKB Uvicord Typ 4701A
und LKB 12000 Varioperpex-Pumpe.
Spektrophotometer PMQ II, Zeiss.
Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer, Modell 3375, Packard.
Automatisches Spektralphotometer, Beckman.
Stock-Zentrifuge.
Präparative Ultrazentrifuge, Modell Beckman Spinco L50.

2.4. Tiermaterial

In allen Versuchen wurden Ratten des Stammes BD IX (32) verwendet.

Transplacentare ÄNH-Applikation:

Weibliche Ratten am 18. Tag der Gravidität, wobei der Tag nach der Konzeption als 1. Tag gezählt wurde. Mittleres Gewicht 247 g ± 25 g. Mittlere Wurfgröße 7. Mittleres Foetengewicht 0,79 g ± 0,08 g.

ÄNH-Applikation nach partieller Hepatektomie:

Männliche Ratten, 80 Tage alt.
Mittleres Gewicht 255 g ± 20 g.

Versuche mit DÄNA:

Männliche Ratten, 64 Tage ± 8 Tage alt.
Mittleres Gewicht 163 g ± 30 g.

Eliminationskinetiken verschiedener äthylierter Basen aus DNS und RNS nach einmaliger ÄNH-Applikation:

10 Tage alte Ratten beiderlei Geschlechts.
Mittleres Gewicht 14,3 ± 1,8 g.

2.5. Chemische Charakterisierung von Äthylnitrosoharnstoff

a) Allgemeine Eigenschaften (28):

Molekulargewicht: 117 g

Zersetzungspunkt: 103 - 104°C

Absorptionsmaximum in wäßriger Lösung: 233 nm

Hydrolysegeschwindigkeit bei 20°C in 1/15 M Sörensen-Puffer:

bei pH 7 $T_{1/2}$= 90 min, bei pH 8 $T_{1/2}$ = 6 min.

b) Stabilität unter angenähert physiologischen Bedingungen:

Um die Verfügbarkeitsdauer des ÄNH im Organismus abschätzen zu können, wurde die Halbwertszeit seines heterolytischen Zerfalls in vitro unter annähernd physiologischen Bedingungen bestimmt. Hierzu wurde bei einer ÄNH-Lösung in 1/15 M Phosphat-Puffer, pH 7,25, die Abnahme der Absorption bei 235 nm und 37°C gemessen. Es ergab sich ein Wert von $T_{1/2}$ = 7,7 min (39).

Vgl. auch Swann u. Magee (98): Nach i.v. Applikation von 200 µg ÄNH/g Kgw. ergab die polarographische Bestimmung des ÄNH im Blut einer Ratte einen Wert von $T_{1/2}$ = 5 - 6 min).

c) Stabilität in "ÄNH-Puffer":

Um einen signifikanten heterolytischen Zerfall des ÄNH vor der Injektion auszuschließen, wurde seine Stabilität in "ÄNH-Puffer" geprüft. Während eines Zeitraumes von 30 min und bei Raumtemperatur blieb die Extinktion einer 0,1 M ÄNH-Lösung bei 235 nm konstant.

2.6. Tierversuche

a) ÄNH-Applikation:

1-^{14}C-ÄNH wurde in "ÄNH-Puffer" gelöst (0,1 M Lösung) und adulten Ratten in einer Dosierung von

75 µg/g Kgw. in eine Schwanzvene injiziert. Bei 10 Tage alten Tieren wurde die gleiche Dosis i.p. appliziert.
Obwohl diese Dosis fast 30 % der LD_{50} für erwachsene gravide Tiere (240 µg/g Kgw. (46))entspricht, ergaben Kontrollexperimente eine hohe Überlebensrate, wenn die Würfe von unbehandelten Ammen aufgezogen wurden. Auch die insgesamt 270 mit dieser ÄNH-Dosis injizierten 10 Tage alten Tiere überlebten alle bis zum Zeitpunkt ihrer Tötung.

b) Applikation von HU:

Der DNS-Synthese-Inhibitor HU wurde in 0,9 % NaCl gelöst und 500 µg HU/g Kgw. an 2 weibliche Ratten am 18. Tag der Gravidität i.p. appliziert. 70 min später wurde ÄNH i.v. injiziert.

c) Applikation von DÄNA:

DÄNA-1-^{14}C wurde in wässriger Lösung (1,5 mg ^{14}C-DÄNA /ml; entsprechend 0,25 mCi/ml) in einer Dosis von 10 µg/g Kgw mit einer Schlundsonde oral appliziert.

d) Partielle Hepatektomie:

An 6 männlichen Ratten wurde eine partielle Hepatektomie nach der von Higgins und Anderson (42) angegebenen Technik durchgeführt.
Der linke und der mittlere Leberlappen wurden nach Unterbindung der Hauptblutgefäße von der restlichen Leber abgetrennt. Das Gewicht der resezierten Teile betrug pro Leber im Mittel 5 g und machte 53 % des gesamten Lebergewichtes aus. Das verbleibende Gewebe unterhalb der Ligatur, das zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere bereits nekrotisch war und verworfen wurde, wog durchschnitt-

lich 0,9 g (≈9 % des Lebergewichtes). Den Tieren verblieben demnach nach der Teilhepatektomie etwa 38 % des ursprünglichen Lebergewebes.

Drei Tieren wurden 11 h, weiteren 3 Tieren 24 h nach der partiellen Hepatektomie 75 µg ÄNH/g Kgw. i.v. injiziert.

Als Indikator für die DNS-Syntheserate wurde jeweils 30 min vor dem ÄNH-Puls ^{3}H-Tdr (0,25 µCi/g Kgw) in physiologischer Kochsalzlösung i.p. appliziert.

e) Entnahme der Foeten und Organe:

Außer bei den Versuchen, in denen die zeitliche Abnahme des Gehaltes der DNS an äthylierten Basen gemessen wurde, wurden die Tiere stets 1 h nach ÄNH-Applikation getötet. Die 10-20 Tage alten Tiere wurden dekapitiert, die adulten Tiere in Äthernarkose nach Durchtrennen der Arteria abdominalis oberhalb der Verzweigung in die Femoralisarterien entblutet. Leber, Gehirn und Foeten wurden dann möglichst schnell herauspräpariert, die jeweils gleichen Gewebe vereinigt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Präparation von Nucleinsäuren aus foetalem Gehirn, foetaler Leber und adulter Leber nach partieller Hepatektomie wurden zur Verbesserung der Ausbeute bekannte Mengen der entsprechenden Gewebe unbehandelter Tiere als "Träger-Material" hinzugefügt. Alle Gewebe wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -60°C aufbewahrt.

Aus Tabelle 1 wird das bei jungen Tieren unproportional hohe Gehirngewicht ersichtlich.

Tabelle 1:

Mittlere Organfrischgewichte bei BD IX-Ratten verschiedener Altersstufen

	Leber (g)	Gehirn (g)
Foet, 18. Tag d. Gravidität	0,053	0,069
10. Tag nach Geburt	0,44	0,74
15. Tag nach Geburt	0,56	0,89
20. Tag nach Geburt	1,11	1,16
adult	7,74(6-10)	1,72

In Versuch 6 wurden zum Vergleich mit den Alkylierungsausbeuten in den Nucleinsäuren von Leber und Gehirn die Nucleinsäuren aus mehreren vereinigten Geweben (Muskel, Niere, Lunge, Milz, Dünndarm) analysiert.

2.7. Präparation von Nucleinsäuren und Protein aus verschiedenen Geweben der foetalen, neugeborenen und adulten Ratte

DNS, RNS und Protein wurden in einem einzigen Präparationsgang nach einer Modifikation der sogen. kombinierten Kirby-Methode (von Kirby selbst nicht mehr veröffentlicht, beschrieben bei (18), theoretische Grundlagen (47)) gewonnen.

Das Gewebe wurde in kalter 0,5% Natrium-Naphthalin-1,5-disulfonsäure, pH 6,8, (10 ml/g Gewebe) homogenisiert (Potter 1300Upm,20 strokes) und mit dem gleichen Volumen Phenolreagens 40 min bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Zentrifugation bei 2200 x g und 0°C für 40 min war folgende Schichtung erkennbar:

a) eine obere,klare, wäßrige Phase, in der die RNS und Polysaccharide gelöst sind,

b) eine weiße Protein-Zwischenschicht,
c) eine untere, braune Phenolphase, welche Proteine und DNS enthält.

Isolierung der RNS

Die wäßrige Oberschicht (a) wurde mit einer hakenförmigen Pipette abgenommen und nach Zusatz von Natriumdodecylsulfat (Endkonzentration 1 %) zur Entfernung von Proteinresten nochmals mit dem halben Volumen Phenolreagens für 20 min extrahiert. Anschließend wurde wieder 40 min bei 2200 x g und 0°C zentrifugiert und die RNS aus dem wäßrigen Überstand mit dem doppelten Volumen Äthanol gefällt. Der in der Kälte nur langsam entstehende flockige Niederschlag wurde durch Zentrifugation konzentriert und in möglichst wenig Wasser gelöst. Die infolge ihres Glykogengehaltes stark opaleszierende Lösung wurde zu dessen Entfernung 1 h bei 100 000 x g zentrifugiert. Aus dem klaren Überstand wurde die RNS mit dem gleichen Volumen einer wäßrigen Cetab-Lösung (1 %)gefällt. Das Cetyltrimethylammoniumsalz wurde mit Wasser gewaschen und zur Bildung des Natriumsalzes mit einer 2% Natriumacetat-Lösung in 70% Äthanol versetzt. Anschließend wurde mit Äthanol, Äthanol/Äther und Äther gewaschen.

Isolierung der DNS:

Die unteren Schichten der Ausgangszentrifugation (braune und weiße Schicht (b) und (c)) wurden mit dem gleichen Volumen einer Lösung von p-Aminosalicylsäure (5 %) und Natriumdodecylsulfat (1%) für 30 min bei Raumtemperatur extrahiert. Dabei werden Protein-DNS-Bindungen durch lipophile und zugleich komplexbildende Salze, wie das p-Aminosalicylat gelöst (47).

Nach Zentrifugation bei 2200 x g und 0°C für 40 min wurde die visköse obere Phase abgenommen und zur Proteinentfernung mehrfach mit dem gleichen Volumen Chloroform/i-Amylalkohol (24:1) extrahiert. Zur Abtrennung des Chloroforms wurde 10 min bei 2200 x g zentrifugiert und die obere wäßrige Phase abgenommen. Die DNS wurde mit dem gleichen Volumen 2-Äthoxy-Äthanol gefällt. Das fädige DNS-Präzipitat wurde in 5% Natriumacetat-Lösung wieder aufgelöst und zur Beseitigung von RNS-Verunreinigungen 1 h bei 37°C mit Ribonuclease (0,1 ml RNase-Lösung/g Ausgangsgewebe, siehe 2.2.) inkubiert. Anschließend wurde die DNS mit dem gleichen Volumen einer wäßrigen Cetab-Lösung (1%) gefällt und wie die RNS zur Bildung des Natrium-Salzes mehrere Stunden mit 2 % Natriumacetat-Lösung in 70% Äthanol behandelt. Das Präzipitat wurde mit Äthanol, Äthanol/Äther und Äther gewaschen.

Protein-Präparation

Nach der DNS-Extraktion wurde die Phenolphase in das fünffache Volumen Methanol gegossen. Das ausfallende Protein wurde durch Zentrifugation gesammelt und zunächst zur Phenolentfernung mit H_2O gewaschen, danach zur Beseitigung restlicher Nucleinsäuren zunächst mehrfach mit kalter, dann mit heißer 5% Trichloressigsäure extrahiert. Anschließend wurde die Trichloressigsäure durch zweimaliges Waschen mit H_2O entfernt. Der Proteinniederschlag wurde zum Herauslösen der Lipide zuerst mit Methanol/Chloroform (1 : 1), dann mit Methanol/Chloroform/conc. HCl (100 : 100 : 1) 30 min bei 50°C behandelt. Schließlich wurde mit Aceton, Äthanol/Äther und Äther gewaschen.
Die Nucleinsäure- und Proteinpräparate wurden bei 0°C unter Stickstoffatmosphäre aufbewahrt.

Tabelle 2:

Mittlere Ausbeuten (mg Präparat/g Ausgangsgewebe)

	DNS	RNS	Protein
Leber, adult	2,1	6,5	178
Leber, 10.-20.Tag	2,7	7,4	185
Gehirn, adult	1,3	0,3	83
Gehirn, 10.-20.Tag	2,1	1,2	68
Foet, 18. Tag d. Gravidität	2,6	3,7	44
Vereinigte Gewebe von Niere, Lunge, Dünndarm, Muskeln, 10.-20. Tag	2,9	3,3	95

2.8. Charakterisierung der Nucleinsäuren

Der absolute DNS-Gehalt der Präparationen wurde mit Hilfe der Diphenylamin-Methode nach Giles u. Myers (38) sowie nach der Indol-Methode (43) bestimmt. Er betrug je nach Präparation 60 - 90 % der Einwaage.

Die RNS wurde nach der Orcin-Methode von Dische u. Schwarz (26) bestimmt. Sie machte 70 - 95 % der Einwaage der RNS-Präparationen aus.

Der RNS-Gehalt der DNS wurde ebenfalls mit Hilfe des Orcintestes bestimmt. Da die DNS hierbei selbst ein Farbprodukt bildet, das bei der gemessenen Wellenlänge ca. 10 % der RNS-Absorption ausmacht, wurde der RNS-Gehalt der DNS bestimmt aus der Differenz der gemessenen Extinktionen und dem theoretisch nach der eingesetzten DNS-Menge berechneten Wert

$$(E_{RNS} = E_{prakt.} - E_{theor.}).$$

Bezogen auf den absoluten DNS-Gehalt der Einwaage ergab sich die RNS-Kontamination der DNS-Präparate zu 2,2 bis 4,6 %.

Die DNS-Verunreinigung der RNS-Präparate war unterschiedlich. Bei RNS-Präparaten aus Leber lag sie nicht über 2 %, bei Präparationen aus Gehirngewebe betrug sie dagegen bis zu 10 %.

Die Proteinkontamination der DNS- und RNS-Präparate wurde mit der Methode von Lowry (66) bestimmt, sie lag nicht über 1 %.

2.9. In vitro-Äthylierung von Rattenleber-DNS durch 1-^{14}C-Äthylnitrosoharnstoff

Aus unbehandelter Rattenleber isolierte DNS wurde in 0,025 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,2, gelöst (ca. 2 mg/ml) und bei 37°C für 1 h mit in "ÄNH-Puffer" vorgelöstem ^{14}C-ÄNH (7,5 mg/100 ml) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abkühlen auf 0° gestoppt und die Lösung viermal gegen 1 Liter 0,025 M Phosphat-Puffer, pH 7,2, dialysiert.

Danach wurde die DNS mit Äthanol gefällt, nochmals gelöst, gefällt und anschließend nach einer der drei angegebenen Methoden hydrolysiert.

2.10. Hydrolyse der Nucleinsäuren

Die Nucleinsäuren wurden nach einer der drei folgenden Methoden hydrolysiert:

a) In 1 N HCl (1 ml/10 mg) 1 h bei 100°C im Wasserbad. Dabei entstehen Pyrimidinnucleotide und die Purine als freie Basen. Während N7-ÄG, N3-ÄA und N7-ÄA unter diesen Bedingungen stabil sind, wird O6-ÄG als säurelabile Verbindung zerstört. (Lawley u. Shah (58) fanden für den Zerfall von O6-MG in 1 N HCl bei 100°C eine Halbwertszeit von $T_{1/2}$ = 12 min).

b) In 70 % Perchlorsäure (1 ml/20 mg) 1 h bei 100°C. Danach wurde mit Wasser 1 : 4 verdünnt und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert.
Bei diesem Vorgehen werden auch die Pyrimidine zu freien Basen hydrolysiert.

c) In 0,1 N HCl (1 ml/2 mg) 20 h bei 37°C (55). Danach wurde mit Ammoniumformiatpuffer, pH 9, neutralisiert und am Rotationsverdampfer auf ein Fünftel des Volumens eingeengt. O6-ÄG bleibt unter diesen schonenden Bedingungen erhalten. Die Methode ist nur für DNS anwendbar; es entstehen Desoxypyrimidinnucleotide und die freien Purinbasen. RNS wird bei dieser Säurekonzentration nicht angegriffen.

2.11. Chromatographie der Nucleinsäurehydrolysate

Vor Beginn der Chromatographie wurden den Hydrolysaten als Marker nicht-radioaktive äthylierte Basen (jeweils 1 mg) zugesetzt. Während der Elution wurde die UV-Absorption mit einem Durchflußphotometer registriert und anschließend in einem Zeiss-Spektralphotometer die optische Dichte ($E^{1\ cm}_{260\ nm}$) für die einzelnen Fraktionen gemessen.

Von den Fraktionen, für die bei 260 nm Absorptionsmaxima registriert worden waren, wurden UV-Absorptionsspektren angefertigt, mit deren Hilfe Absorptionspeaks den entsprechenden Basen zugeordnet werden konnten. Folgende Säulen wurden zur Trennung der Hydrolysate eingesetzt:

1. Dowex 50 W x 12, H^+ Form;
2. Sephadex G 10.

2.11.1. Kationenaustauschersäule

Die stark sauren Hydrolysate wurden auf eine Kationenaustauschersäule, Dowex 50 WX 12, 200-400 mesh, H^+-Form, (1 cm x 15 cm) aufgetragen, die mit 0,1 N HCl equilibriert war. Dann wurde mit einem exponentiellen Salzsäuregradienten (1 N ⟶ 4 N HCl) mit einer Geschwindigkeit von 30 ml/h eluiert und das Eluat in 12 ml-Fraktionen aufgefangen (s. Abb. 1). Das Volumen der Mischgefässe betrug 300 ml. Bei den Perchlorsäurehydrolysaten wurden nach dem Auftragen des Hydrolysates zunächst 150 ml 0,1 N HCl vorgegeben. Bei dieser Trenntechnik erscheinen unmittelbar nach dem Start der Elution die Pyrimidinnucleotide, im Fall der RNS zuerst UMP und direkt danach CMP. Nach Perchlorsäurehydrolyse er-

Tabelle 3:

Elutionsreihenfolge der Basen eines Nucleinsäurehydrolysates bei Chromatographie über eine Dowex 50 WX-Säule, H^+-Form, 1 cm x 15 cm, mit exponentiellem HCl-Gradienten. Die Position der Elution einer Base wurde aus ihrem Elutionsvolumen berechnet und als Prozent von dem des Adenins angegeben.

	Normalität d. HCl b. Elution	Positionen	
		bei HCl-Hydrolysat	bei HClO - Hydrolysat
"Anfangspeak"		3-6 (einschl. UMP bzw. TMP)	3-7 (einschl. U und T)
CMP		9	-
Cytosin	2	-	42
Guanin	2,6	55	60
N3-ÄA	2,8	70	73
N7-ÄG	2,9	86	88
Adenin	>2,9	100	100
N7-ÄA	3,2	108	107

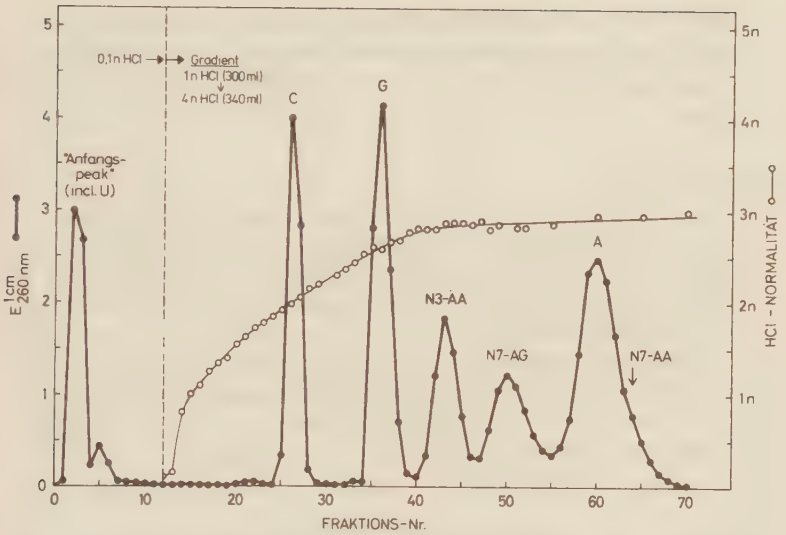


Abb. 1: Elutionsdiagramm eines RNS-Hydrolysates auf einer Dowex 50 WX 12-Säule (1 cm x 15 cm) mit einem exponentiellen Salzsäuregradienten. Die RNS wurde in 70% Perchlorsäure 1h bei 100°C hydrolysiert.

scheinen zuerst die Pyrimidinbasen Uracil bzw. Thymin Cytosin wird erst später eluiert. Von den Purinbasen wird zuerst das Guanin und zuletzt bei hoher Säurekonzentration das Adenin eluiert. N3-ÄA und N7-ÄG erscheinen im Eluat zwischen Guanin und Adenin, zuerst N3-ÄA und, kurz vor dem Adenin, N7-ÄG. N7-ÄA wird unmittelbar nach dem Adenin eluiert und konnte daher nicht vom Adeninpeak getrennt werden.

2.11.2. Sephadex G 10

Zum Nachweis von O6-ÄG wurde das Hydrolysat nach der milden Hydrolyse in 0,1 N HCl auf eine Sephadex-G 10-Säule (1,5 cm x 80 cm) gebracht, die mit 0,05 M Ammoniumformiat-Puffer, pH 6,8, equilibriert war, und dann mit 1,2 l des gleichen Puffers mit einer Durchflußrate von 50 ml/h ent-

wickelt (58). Es wurden Fraktionen von 16 ml gesammelt. Bei dieser Trenntechnik wird die offensichtlich recht spezifische Adsorption des Sephadex zur Trennung der Purinbasen genutzt.

Tabelle 4:

Elutionsreihenfolge der Purinbasen eines DNS-Hydrolysates bei Chromatographie über eine Sephadex G10-Säule (1,5 cm x 80 cm) mit 0,05 M Ammoniumformiat-Puffer, pH 6,8). Die Position der Elution einer Base wurde aus ihrem Elutionsvolumen berechnet und als Prozent von dem des Adenins angegeben.

	Positionen
Anfangspeak (mit Pyrimidinnucleotiden)	12 - 17
N3-ÄA	32 oder 58+
N7-ÄA	55
N7-ÄG	69
Guanin	81
Adenin	100
O6-ÄG	146

+Die Elution von N3-ÄA war in einem schmalen Bereich abhängig vom pH-Wert des Hydrolysates. Bei pH 5,9 wurde N3-ÄA gleich zu Beginn eluiert, bei pH 6,2 erst nach dem N7-ÄA.

2.12. Synthese von N7-Äthylguanin

Das bei der Chromatographie als Marker verwendete N7-ÄG wurde nach einer Präparationsvorschrift von Brookes and Lawley (9) dargestellt. Einer Lösung von Desoxyguanosin-5'-phosphat in 0,4 N Phosphat-Puffer, pH 7,2, wurde eine äquimolare Menge Diäthylsulfat zugesetzt und das Gemisch für 120 h bei 37°C inkubiert. Das gebildete N7-Äthyl-desoxyguanosin-5'-phosphat besitzt eine sehr labile N-glykosidi-

sche Bindung, die bereits in neutraler Lösung hydrolytisch aufgespalten wird. Das entstehende N7-Äthylguanin fällt in farblosen Kristallen aus. Es wurde durch Chromatographie auf einer Dowex 50 WX-Säule gereinigt.

2.13. Charakterisierung der untersuchten äthylierten Purinbasen

Die äthylierten Purinbasen N3-ÄA, N7-ÄA, N7-ÄG und O6-ÄG wurden in nicht-radioaktiver Form als "Marker" den Nucleinsäurehydrolysaten zugesetzt. Sie konnten mit Hilfe ihrer UV-Absorptionsspektren charakterisiert und so bei den Trennungen identifiziert werden.

Tabelle 5:

Absorptionsspektren äthylierter Purinbasen

Äthyl.Base	pH d.Lsg.	$\lambda_{min.}$	$\lambda_{max.}$	$\frac{E\ 280}{E\ 260}$	$\varepsilon_{max}(x10^{-3})$
N3-ÄA	<1,0	236	274	1,33	15,1
	6,8	242	274		
N7-ÄA	<1,0	230	268	0,79	10,3
	6,8	231	271		
N7-ÄG	1,0	228;168	250;274	0,84	5,0;7,8
	6,0	232;261	245;284	1,41	2,7;2,5
	12,0	255	280	1,53	4,4
O6-ÄG	6,8	227;257	241;281	2,45	6,9;7,8

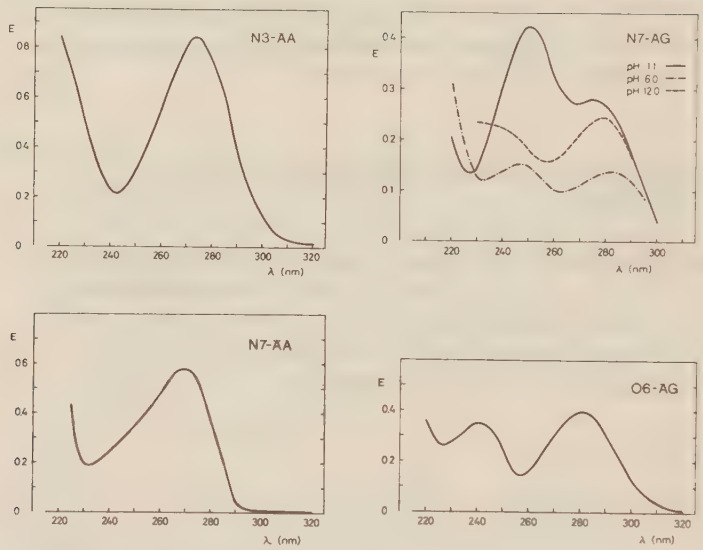


Abb. 2: UV-Absorptionsspektren der äthylierten Purinbasen N3-ÄA, N7-ÄA und O6-ÄG bei neutralem pH. Im Falle des N7-ÄG sind die Spektren für 3 verschiedene pH-Werte angegeben.

2.14. Messung der Radioaktivität

In den Versuchen I-IV wurden die Fraktionen nach der chromatographischen Trennung in Szintillationsgläschen bei 60°C eingetrocknet, der Rückstand in 0,5 ml NCS-Lösung (20 h bei 60°C) gelöst und 10 ml Toluol-Szintillator zugegeben.

Aus Gründen der Zeitersparnis wurden in späteren Versuchen jeweils 5 ml-Aliquots der Fraktionen gemessen. Nach Säulentrennung mit Ammoniumformiat wurden diese Aliquots jeweils mit 10 ml Triton X-Szintillator gemischt, nach Trennung mit

einem HCl-Gradienten mit 10 ml Instagel. Die ^{14}C-Aktivität wurde im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer (Packard; Standard-Einstellung für ^{14}C) gemessen. Dabei lag die Zählausbeute zwischen 70 und 80 %. Nach Background-Subtraktion wurde mit Hilfe eines externen Standards auf dpm und dann auf die Gesamtaktivität der Fraktionen (dpm/Fraktion) umgerechnet.

In Versuch II wurde neben der ^{14}C- auch die Tritiumaktivität bestimmt. Dabei wurde folgende Einstellung gewählt:

für ^{3}H: Kanalbreite 50 - 100; 60 %,
für ^{14}C: Kanalbreite 150 - 1000; 12 %.

Bei dieser Einstellung lag die Zählausbeute für ^{3}H bei 5 - 6 %, für ^{14}C bei 60 %.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Nucleinsäure- und Protein-Präparationen wurden jeweils 2-4 mg Substanz in Szintillationsgläser eingewogen und in 0,5 ml NCS-Lösung nach Zugabe von einem Tropfen Wasser durch Inkubation bei 50°C für 20 h gelöst. Dann wurden je 10 ml Toluol-Szintillator zugefügt und die ^{14}C-Aktivität gemessen.

2.15. Berechnung des Anteils äthylierter Purinbasen in DNS oder RNS

Als Maß für den Anteil einer gebildeten Äthylpurinbase (ÄP) an der Gesamtmenge der entsprechenden Purinbase (P) wurde der Quotient $\frac{ÄP}{P}$ verwendet. Die Menge (C) der äthylierten Basen in DNS oder RNS wurde aus der integralen ^{14}C-Aktivität des entsprechenden chromatographischen Peaks berechnet unter der Annahme, daß die spezifische Aktivität der gebildeten Äthylpurinbase (ÄP) derjenigen des applizierten ÄNH-Präparates entsprechen muß

$$C_{ÄP}\ (mM) = Aktivität_{AP}\ (mCi)/spez.Aktivität\ (mCi/mM).$$

Für DÄNA-1-^{14}C gilt, daß 1 Mol gebildete Äthylpurinbase einem halben Mol des applizierten DÄNA-1-^{14}C entspricht. Die gefundene Aktivität muß also in diesem Falle mit dem Faktor 2 multipliziert werden. Die Menge der Purinbasen Guanin und Adenin wurde aus der Gesamtextinktion des jeweiligen Peaks berechnet. Folgende molare Extinktionskoeffizienten wurden zugrunde gelegt (13):

pH-Wert	ε_{260} für Guanin	ε_{260} für Adenin
< 1	8000	12000
~7	7200	13300

Die über den C_2-Stoffwechsel erfolgende "metabolische" ^{14}C-Markierung der Purinbasen lag, als molarer Anteil der radioaktiv markierten Adenin- oder Guanin-Moleküle ausgedrückt, im Bereich von 10^{-3} bis 10^{-4}. Deshalb war eine Korrektur für infolge metabolischer Markierung doppelt ^{14}C-markierte Moleküle überflüssig.

2.16. Papierchromatographischer Nachweis von N7-Äthylguanin

Leber-RNS von ^{14}C-ÄNH-behandelten adulten Ratten wurde hydrolysiert, auf einer Dowex 50 WX-Säule mit einem HCl-Gradienten chromatographiert und die vor dem Adenin eluierten radioaktiven Fraktionen eingeengt. Diese wurden dann auf Whatman-Papier No. 17 in Methanol-con. HCl-H_2O (7:2:1) (18) mit nicht-radioaktivem N7-Äthylguanin als Marker für 3 h co-chromatographiert. Anschließend wurde das N7-ÄG mit einer 254 nm UV-Lampe lokalisiert und das Chromatogramm in 1/2 cm breite Streifen geschnitten. Diese wurden mit 1 ml 5 % TCA eluiert und die ^{14}C-Aktivität der Eluate gemessen. Der Absorptionsfleck des N7-ÄG und die Stelle mit maximaler ^{14}C-Aktivität stimmten überein (Rf-Wert ~ 0,44).

2.17. Bestimmung der Stabilität der äthylierten Purinbasen in der DNS in vitro

a) bei 100°C:

In vitro mit ÄNH äthylierte Rattenleber-DNS wurde in verdünntem SSC-Puffer (siehe 2.2.), pH 7, gelöst und diese Lösung für 2 h im Wasserbad auf 100°C erhitzt. Danach wurde die Lösung für 48 h gegen H_2O dialysiert und anschließend mit Äthanol gefällt. Dann wurde die DNS für 20 h in 0,1 n HCl bei 37°C hydrolysiert und über eine Sephadex G10-Säule getrennt.

b) bei 37°C:

Aus den restlichen Geweben ÄNH-behandelter Ratten, denen zuvor Leber und Gehirn entnommen worden waren, wurde die DNS isoliert. Sie wurde in 0,025 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,2, mit einem Natriumazidgehalt von 0,02 % gelöst und bei 37°C inkubiert. Als Funktion der Zeit nach Inkubationsbeginn wurde der Lösung jeweils eine Probe entnommen. Die DNS wurde mit 1 % Cetab-Lösung gefällt, gründlich gewaschen und durch Behandlung mit 2 % Natriumacetatlösung in 70 % Äthanol wieder in ihr Natriumsalz überführt. Danach wurde sie in 0,1 N HCl hydrolysiert und die Basen auf einer Sephadex G10-Säule getrennt.

3. Ergebnisse

3.1. Initiale Äthylierung von Nucleinsäuren durch Äthylnitrosoharnstoff

3.1.1. Äthylierung von Purinbasen bei der Reaktion von Rattenleber-DNS mit Äthylnitrosoharnstoff-1-^{14}C in vitro

Um die äthylierende Wirkung des carcinogenen Nitrosamids ÄNH auf DNS in vitro zu testen, wurde Rattenleber-DNS für 1 h bei 37°C mit 1-^{14}C-ÄNH inkubiert. Dabei betrug die DNS-Konzentration der Lösung 1 mg/ml, die ÄHN -Konzentration 43 bzw. 75 µg/ml.

Von der eingesetzten ^{14}C-Aktivität wurde nur ein sehr geringer Teil an die DNS gebunden, und zwar ergab sich bei beiden Konzentrationen ein Wert von 0,02 % ± 0,001 %.

Die spezifische ^{14}C-Aktivität der DNS war der ÄNH-Konzentration proportional, und zwar betrug sie pro µg eingesetztes ^{14}C-ÄNH 24,7 ± 0,4 dpm/mg DNS.

3.1.1.1. Analyse durch Trennung des DNS-Hydrolysates über eine Ionenaustauschersäule

Ein Teil der in vitro mit ^{14}C-ÄNH äthylierten DNS wurde in 1 N HCl hydrolysiert, ein anderer Teil in 70% Perchlorsäure. Im letzteren Fall werden auch die Pyrimidinnucleotide zu den Basen gespalten. Die Hydrolysate wurden auf einer Dowex 50 H^+-Säule mit einem exponentiellen HCl-Gradienten getrennt und die ^{14}C-Aktivität der Fraktionen gemessen. Neben dem N7-ÄG konnten N3-ÄA und N7-ÄA mit Hilfe von nicht radioaktiven Marker-Basen lokalisiert werden. N7-ÄG wurde außerdem papierchromatographisch identifiziert (vgl. 2.16.). Die Elutionsreihenfolge sowie die Positionen der einzelnen Basen, bezogen auf Adenin, sind in 2.11.1 aufgeführt. Abb. 3 zeigt je ein Beispiel für eine Trennung der beiden

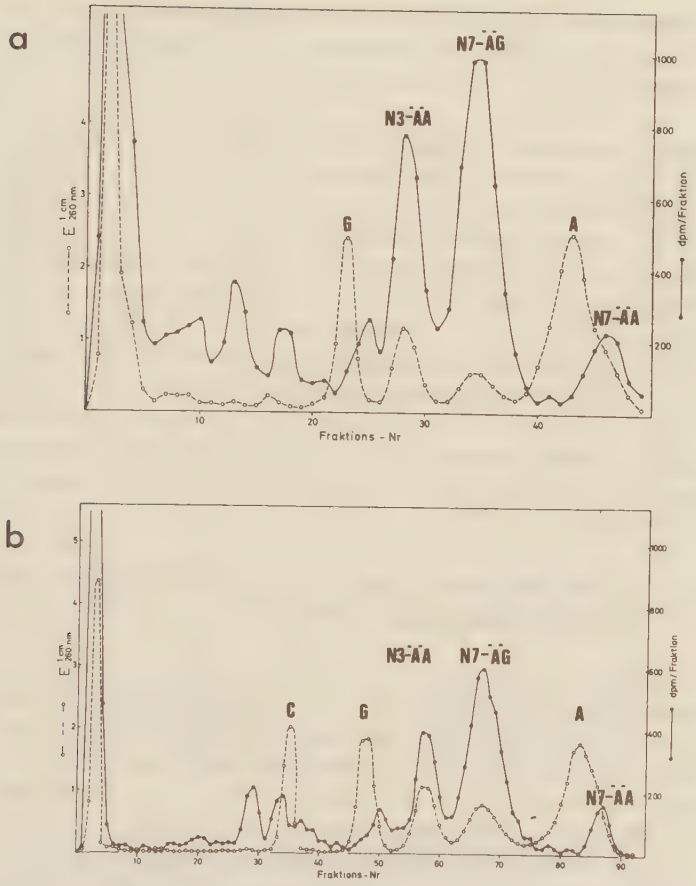


Abb. 3: Radiochromatogramme von in vitro mit ^{14}C-ÄNH äthylierter DNS, die a) in 1 N HCl und b) in 70% $HClO_4$ für jeweils 1 h bei 100°C hydrolysiert wurde, nach Trennung der Basen über eine Dowex 50 WX12-Säule mit einem exponentiellen HCl-Gradienten. Zu dem Hydrolysat wurden N7-ÄG, N3-ÄA und N7-ÄA als nicht-radioaktive Marker zugesetzt.

verschiedenen Hydrolysate. Die im N3-ÄA-Peak eluierte ^{14}C-Aktivität betrug ca. 50 % der im N7-ÄG-Peak eluierten, die im N7-ÄA-Peak eluierte dagegen nur ca. 10 %.

Drei kleinere radioaktive Peaks, zwei vor dem Guanin und einer zwischen Guanin und N3-ÄA konnten nicht identifiziert werden. Bei letzterem könnte es sich um N3-ÄG handeln, da seine Position sehr der von Lawley u. Shah (58) für N3-MG beschriebenen ähnelt und die Übereinstimmung der Positionen von methylierten und äthylierten Purinbasen in anderen Fällen gut ist. Bezogen auf A = 100 (siehe Tabelle 3) wird N3-MG in diesem System bei Position 57 eluiert, der nicht identifizierte radioaktive Peak bei Position 58. - Bei den beiden anderen radioaktiven Peaks kann zumindest ausgeschlossen werden daß es sich um äthylierte Purinbasen handelt, da sie sowohl nach Hydrolyse in $HClO_4$ als auch in HCl auftreten.

3.1.1.2. Analyse durch Trennung des DNS-Hydrolysates über eine Sephadex G 10-Säule

Neuere Untersuchungen (65, 36) deuten auf die mögliche Bedeutung einer Alkylierung am O6 des Guanins als mutagenes Ereignis hin. Bei den in Abschnitt 3.1.1.1. verwendeten Hydrolyse-Methoden (1N HCl oder 70% Perchlorsäure) wäre O6-ÄG zerstört worden, da dieses Äthylierungsprodukt als Enoläther säurelabil ist (65, 58). Nach Lawley u. Thatcher (55) bleibt O6-Alkylguanin bei Hydrolyse der DNS unter milden Bedingungen (0,1 N HCl, 20h bei 37°C) dagegen intakt. Zur Trennung methylierter Purinbasen im neutralen pH-Bereich geben Lawley u. Shah (58) eine Trennmethode über eine Sephadex G 10-Säule an, die sich in den vorliegenden Untersuchungen als ebenso geeignet zur Trennung äthylierter Purine erwies. Sie liefert scharfe, gut reproduzierbare Peaks. N3-ÄA, N7-ÄA, N7-ÄG und O6-ÄG konnten mit Hilfe der entsprechenden nicht-radioaktiven Marker-Basen lokalisiert werden (Elutionsreihenfolge siehe 2.11.2.). O6-ÄG wird zuletzt und in

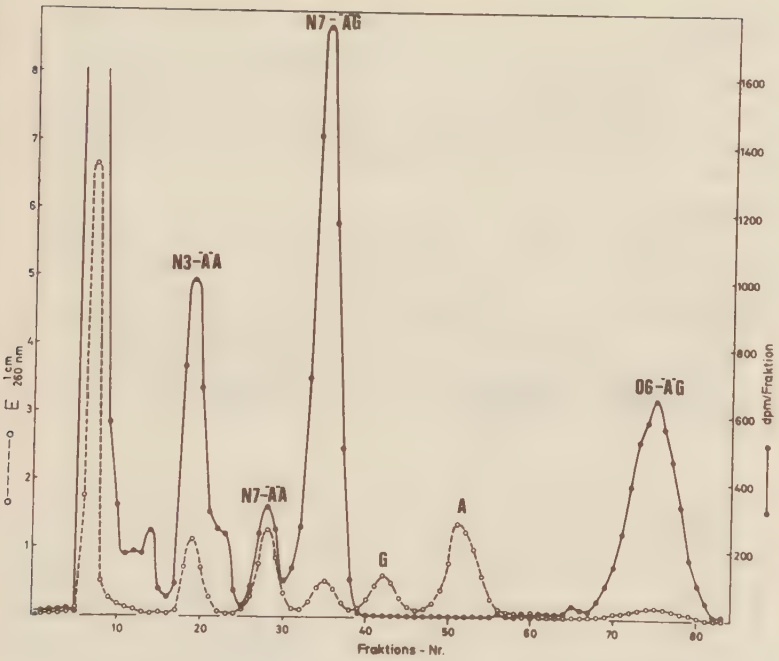


Abb. 4: Radiochromatogramm von in vitro mit ^{14}C-ÄNH äthylierter Rattenleber-DNS, in 0,1 N HCl für 20h bei 37°C hydrolysiert nach Trennung der Basen über eine Sephadex G10-Säule mit 0,05 M Ammoniumformiat-Puffer

weitem Abstand zum Adenin eluiert. Das Radiochromatogramm einer in dieser Weise getrennten, in vitro mit ^{14}C-ÄNH äthylierten Rattenleber-DNS ist in Abb. 4 wiedergegeben. Auch hier traten kleinere Radioaktivitäts-Peaks auf, die nicht identifiziert werden konnten. Bei einem von ihnen könnte es sich wiederum um N3-ÄG handeln, da seine Position auf A = 100 bezogen (vgl. Tab. 4) bei 45 lag (zum Vergleich N3-MG=43 (58)). Die relativen Anteile der einzelnen Äthylpurinbasen und der molare Anteil der äthylierten Basen an der Gesamtmenge der entsprechenden Base sind in Tab. 6 aufgeführt.

Tabelle 6:

Äthylierte Purinbasen bei in vitro-Reaktion von Rattenleber-DNS mit ÄNH.
Rattenleber-DNS (1 mg/ml) wurde bei 37°C für 1 h mit 43 bzw. 75 µg ^{14}C-ÄNH/ml inkubiert und die DNS nach Hydrolyse über eine Sephadex G 10-Säule getrennt. Insgesamt wurden 8 Trennungen durchgeführt.

Spalte 1:
Relative Anteile der einzelnen Äthylpurinbasen in Prozent der ^{14}C-Aktivität aller identifizierten Basen (± Standardabweichung)

Spalte 2:
Molarer Anteil der äthylierten Purinbasen an der Gesamtmenge der entsprechenden Basen (± Standardabweichung).
Hierbei wurde unter Annahme einer linearen Beziehung zwischen ÄNH-Konzentration und Äthylierungsgrad in 3 Fällen von der eingesetzten ÄNH-Konzentration von 43 µg/ml auf 75 µg/ml umberechnet.

Äthylierte DNS-Purinbasen	1	2
N7-ÄG	46 % ± 5 %	9,8 (± 1,9) x 10^{-5}
O6-ÄG	29 % ± 2 %	6,2 (± 1,1) x 10^{-5}
N3-ÄA	22 % ± 4 %	2,5 (± 0,3) x 10^{-5}
N7-ÄA	4 % ± 2 %	0,6 (± 0,4) x 10^{-5}

3.1.1.3. "Anfangspeak"

Die ^{14}C-Aktivität der untersuchten DNS-Äthylpurinbasen macht nur 20-30 % der eluierten ^{14}C-Gesamtaktivität aus. Der Hauptteil der ^{14}C-Aktivität erscheint bei beiden Trennmethoden im Durchfluß und beim Start der Elution; er macht 66-70 % der gesamten eluierten ^{14}C-Aktivität aus. Dieser Anfangspeak besteht möglicherweise aus verschiedenen Komponenten. Über das Material läßt sich mit Sicherheit nur aussagen, daß es, da es nicht an den Kationenaustauscher bindet, in saurer Lösung ungeladen ist. Auch von anderen Arbeitsgruppen wurde nach Anwendung verschiedener radioaktiv markierter Cancerogene (DMN, MNH) ein solcher radioaktiver Peak bei der chro-

matographischen Trennung der Nucleinsäurehydrolysate beobachtet (58, 82, 83, 59). Wahrscheinlich handelt es sich u.a. um die von Bannon u. Verly (4) beschriebenen Phosphotriester, welche durch Reaktion der Phosphodiestergruppen in der Zucker-Phosphat-Kette mit einem alkylierenden Agens, in diesem Fall ÄNH, gebildet werden.

3.1.2. Gehalt äthylierter Purinbasen in den Nucleinsäuren verschiedener Rattengewebe 1 Std. nach Applikation von Äthylnitrosoharnstoff-1-^{14}C in vivo

3.1.2.1. N7-Äthylguanin in Nucleinsäuren aus foetalem und adultem Gewebe

Krüger et al. (55)hatten eine Äthylierung von Leber- oder Gehirnnucleinsäuren der Ratte durch ÄNH in vivo nicht nachweisen können. Der Befund dieser Arbeit wurde daher mit einem ÄNH-Präparat einer 50-fach höheren spezifischen ^{14}C-Aktivität überprüft, und zwar an Nucleinsäuren aus adultem und foetalem Rattengewebe 1 h nach i.v.Applikation von ^{14}C-ÄNH (75 µg/g Kgw) an weibliche Ratten (18. Tag der Gravidität). Dabei wurde primär nur Auftreten und Grad einer Äthylierung am N7 des Guanins untersucht, da bei methylierenden Agentien N7-MG mehr als 80 % der Methylierungsprodukte ausmacht (54, 58). Der Grad der N7-Guanin-Äthylierung in den Nucleinsäuren aus Gehirn und Leber wurde verglichen, d.h. in einem Gewebe (Gehirn), in welchem nach Anwendung von ÄNH spezifisch maligne Tumoren entstehen, und einem Gewebe (Leber), in dem maligne Tumoren nach Applikation von ÄNH nicht beobachtet werden.

Ein Vergleich der spez.^{14}C-Aktivitäten der Nucleinsäure- und Proteinpräparationen aus diesen Geweben liefert erste Anhaltspunkte (Tabelle 7). Sowohl bei foetalem als auch bei adultem Gewebe war die spezifische ^{14}C-Aktivität der Nucleinsäurepräparate (wie auch der Gesamtproteine) aus

Leber stets höher als der entsprechende Wert für Gehirn. Während bei den Nucleinsäurepräparaten die Leberwerte um etwa einen Faktor 2 höher lagen, war bei den Proteinen der Unterschied noch erheblicher. Diese Unterschiede sind möglicherweise darauf zurückzuführen, daß über die Blutbahn nicht gleich viel ÄNH zum Gehirn gelangt wie zur Leber. Kleihues u. Patzschke (48) untersuchten mit Hilfe der Ganzkörperautoradiographie die Verteilung von ^{14}C-MNH in der Ratte. Dabei ergab sich 2 min nach i.v.Injektion des MNH eine etwa zweifach höhere ^{14}C-Markierung in der Leber als im Gehirn.

Tabelle 7:

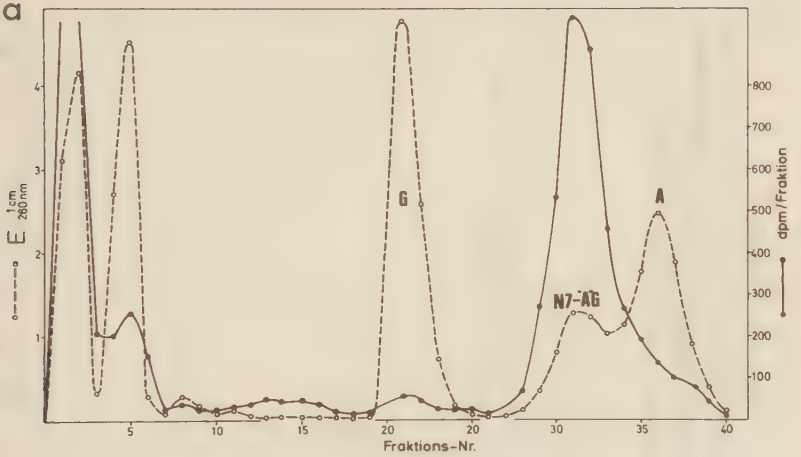
Spezifische ^{14}C-Aktivität der Nucleinsäure- und Protein-Präparationen aus verschiedenen Rattengeweben, 1 h nach Puls-Applikation von 75 µg ^{14}C-ÄNH/g Kgw an Ratten (18. Tag der Gravidität)

Gewebe	Spez. ^{14}C-Aktivität (dpm/mg) x 10^{-3} in:		
	DNS	RNS	Protein
Gesamtfoet	2,9	2,3	4,1
foetales Gehirn	3,2	2,9	1,0
foetale Leber	9,0	5,9	3,8
adultes Gehirn	1,1		0,8
adulte Leber	2,7	2,4	10,5

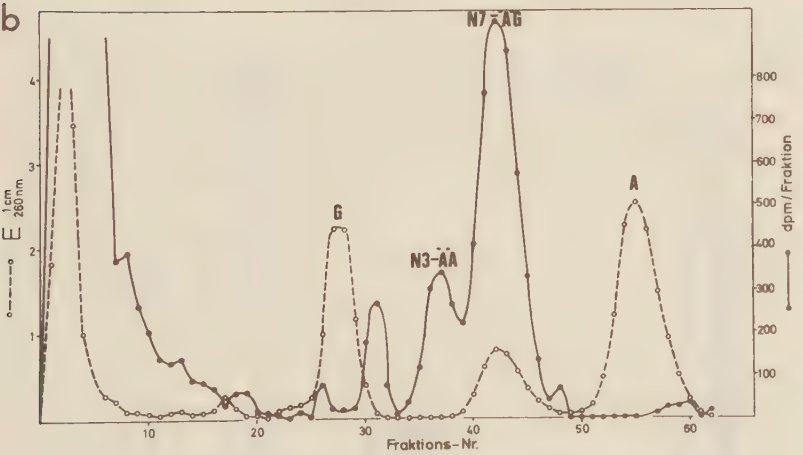
Die aus den verschiedenen Geweben isolierten Nucleinsäuren wurden nach Hydrolyse in 1 N HCl über eine Dowex 50 H^+-Säule mit einem exponentiellen Salzsäuregradienten getrennt und die Aktivität der Fraktionen gemessen. Einige typische Beispiele der erhaltenen Radiochromatogramme sind in Abb. 5 (a-e) wiedergegeben.

In den Nucleinsäuren aller untersuchter Gewebe konnte N7-ÄG nachgewiesen werden. Der molare Anteil des N7-ÄG am Gesamt-Guanin von DNS und RNS lag in der Größenordnung von

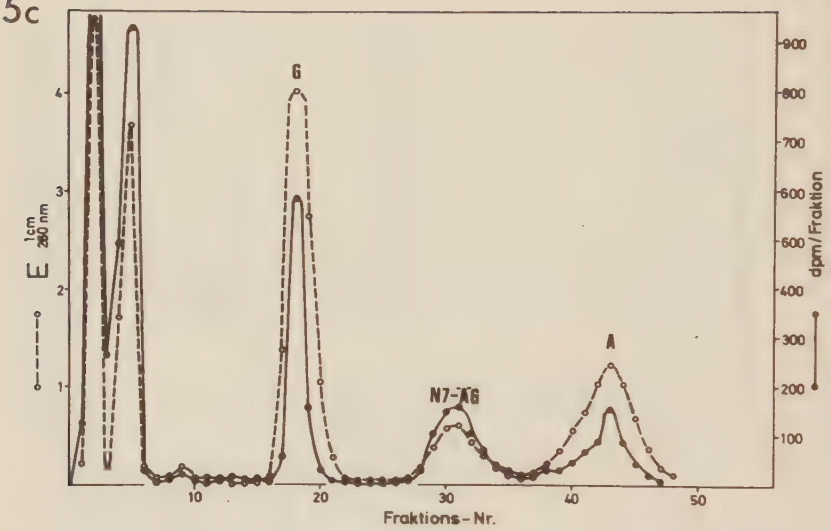
5a


E 1cm 260nm
dpm/Fraktion
G
A
N7-AG
Fraktions-Nr.

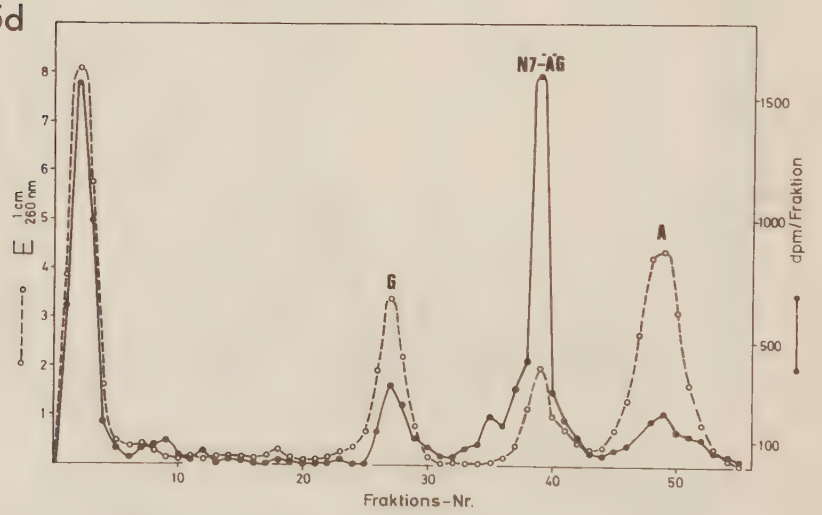
5b


E 1cm 260nm
dpm/Fraktion
N7-AG
G
N3-AA
A
Fraktions-Nr.

5c


G
N7-AG
A
E 1cm 260 nm
dpm/Fraktion
Fraktions-Nr.

5d


N7-AG
G
A
E 1cm 260 nm
dpm/Fraktion
Fraktions-Nr.

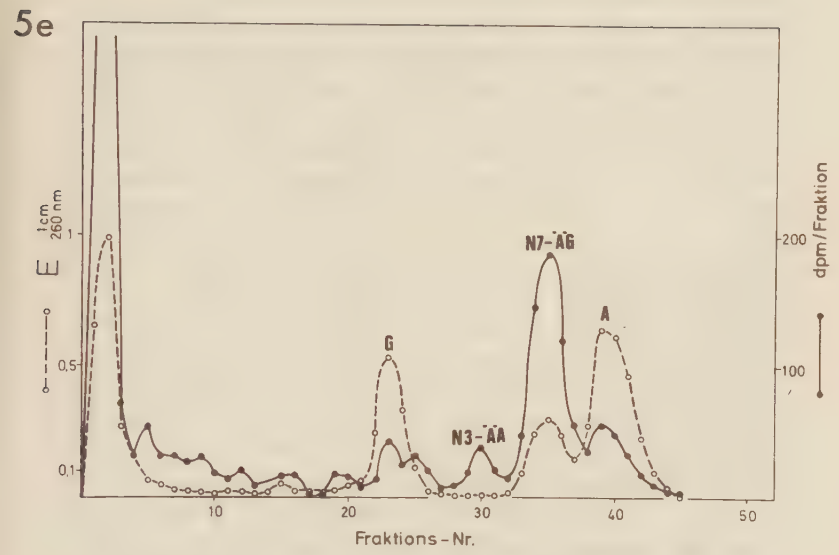


Abb. 5 a - e: Ionenaustauscher-Radiochromatogramme von DNS- und RNS-Hydrolysaten aus ganzen Foeten (18.Tag der Gravidität), foetalem Gehirn und adulter Leber der Ratte 1 h nach Applikation von 75 µg ^{14}C-ÄNH/g Kgw nach Trennung der Basen über eine Dowex 50 WX12-Säule. Allen Hydrolysaten wurde nicht-radioaktives N7-ÄG als Marker zugesetzt.

a) RNS, adulte Leber
b) DNS, adulte Leber
c) RNS, ganzer Foet
d) DNS, ganzer Foet
e) DNS, foetales Gehirn

Tabelle 8:

N7-ÄG-Bildung in der DNS und RNS verschiedener Rattengewebe, 1 h nach Puls-Applikation von 75 µg ^{14}C-ÄNH/g Kgw an Ratten (18. Tag der Gravidität), angegeben als molarer Anteil von N7-ÄG am Gesamt-Guanin (N7-ÄG/G)

Gewebe	N7-ÄG/G (x 10^{5}) in: DNS	RNS
Foet (n = 16)	1,7 xx	0,6 xx
Foetales Gehirn (gepoolte Gehirne, n = 36)	2,2	- x
Foetale Leber (gepoolte Lebern, n = 36)	4,4	0,9
Adultes Gehirn (gepoolte Gehirne, n = 10)	2,1	- x
Adulte Leber (gepoolte Lebern, n = 10)	3,5 xx	1,4 xx

x Die RNS-Ausbeuten aus foetalem und adultem Gehirn waren so gering (< 5 mg), daß eine Analyse nicht durchgeführt werden konnte.

xx Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen; maximale Abweichung vom Mittelwert ≤ 25 %.

10^{-5} (siehe Tabelle 8). Die Ausbeute an N7-ÄG war in der DNS stets höher als in der RNS (Faktor 2,5 - 5).

Der höchste N7-ÄG-Gehalt wurde in der DNS der foetalen Leber gefunden. Es folgte die DNS der adulten Leber. Die Werte für die DNS des foetalen und adulten Gehirns sowie des Gesamtfoeten waren ungefähr halb so groß. - In den DNS-Radiochromatogrammen, besonders deutlich im Falle der Leber-DNS, traten zwischen Guanin und N7-ÄG zusätzliche kleinere Radioaktivitäts-Peaks auf. Bei dem unmittelbar vor dem N7-ÄG eluierten Radioaktivitäts-Peak handelt es sich, wie unter 3.1.1.1 gezeigt, um N3-ÄA.

Die Nucleinsäuren aus foetalem und adultem Gewebe unterscheiden sich bezüglich des Einbaus von ^{14}C-Aktivität in die normalen Purinbasen. Während die ^{14}C-Aktivität in den Positionen von Guanin und Adenin im Falle der Nucleinsäuren aus adultem Gewebe vernachlässigbar gering ist, erreicht sie vor allem bei der RNS aus foetalem Gewebe relativ hohe Werte. Dies muß wohl auf die höhere Stoffwechselaktivität der foetalen Gewebe zurückgeführt werden.

3.1.2.2. Äthylpurinbasenmuster in verschiedenen Geweben

Nachdem eindeutig nachgewiesen wurde, daß die Nucleinsäuren der untersuchten Gewebe auch in vivo durch ÄNH äthyliert werden und daß unter in vitro-Bedingungen neben dem Hauptprodukt N7-ÄG auch andere äthylierte Purinbasen entstehen, war zu prüfen, ob die Verteilungsmuster der äthylierten Basen nach in vivo- und in vitro-Reaktion mit ÄNH übereinstimmen und ob sie bei in vivo-Reaktion in den einzelnen Geweben gleich sind oder Unterschiede aufweisen.

Die nach einmaliger ÄNH-Applikation aus verschiedenen Rattengeweben isolierte DNS wurde nach Auftrennung über eine Sephadex G10-Säule hinsichtlich des Auftretens und Gehalts der verschiedenen Äthylierungsprodukte untersucht. Die Anteile der einzelnen Äthylpurinbasen in der DNS aus Gehirn adulter und 10 Tage alter Ratten, aus dem Gewebe von "18 Tage-Foeten" sowie den "Rest-Geweben" 10 Tage alter Tiere sind in Tabelle 9 aufgeführt. Sie wurden als prozentualer Anteil an der ^{14}C-Aktivität aller identifizierter Äthylierungsprodukte angegeben. Für die einzelnen Gewebe ergeben sich dabei sehr ähnliche Verteilungsmuster. Einzig die Werte für die DNS aus adultem Gehirn fallen etwas heraus. Das Material reichte hier jedoch nur zu einer Trennung aus. So war es nicht möglich zu prüfen, ob der im Vergleich zu den übrigen Werten niedrigere N7-ÄG-Wert und der höhere N3-ÄA-Wert tatsächlich für dieses Gewebe charakteristisch oder in Anbetracht der eingesetzten geringen Gesamtaktivität auf eine geringere Meßgenauigkeit zurückzuführen ist (vgl. entsprechende Werte

Tabelle 9:

Äthylierungsprodukte in der DNS verschiedener Rattengewebe 1 h bzw. 4 h nach einmaliger Applikation von 75 µg ^{14}C-ÄNH/g Kgw.

Spalte 1: Gewebe

Spalte 2: Zeit nach ÄNH-Puls (h)

Spalte 3: prozentualer Anteil der ^{14}C-Aktivität im "Anfangspeak"

Spalte 4: relative Anteile der gebildeten äthylierten Basen, angegeben in Prozent der ^{14}C-Aktivität aller identifizierter Basen (jeweils rechts die Mittelwerte für mehrere Trennungen)

1	2	3	4		
			N7-ÄG	O6-ÄG	N3-ÄA
Leber, adult	1	73	54,4	20,4	25,2
	1	79	60,1	20,6	19,2
	1	97	55,1 56,6	29,1 24,9	15,7 18,4
	1	93	55,0	26,8	18,0
	1	97	58,2	27,7	14,1
Gehirn, adult	1	76	45,0 45,0	28,0 28,0	27,0 27,0
Leber, 10. Tag n.Geb.	1	65	53,6	27,4	19,0
	4	82	62,0 57,8	27,3 27,4	10,7 14,9
Gehirn, 10. Tag n.Geb.	1	54	58,5	26,2	15,3
	4	76	55,9 57,2	34,1 30,2	9,9 12,6
Rest-Gewebe, 10. Tag n.Geb.	1	88	57,6	32,3	10,1
	4	71	62,1 58,6	23,9 29,6	14,0 11,9
	4	91	56,0	32,5	11,7
Gesamtfoeten, 18. Tag der Gravidität	1	73	53,9	24,3	21,8
	1	97	48,3 50,6	33,1 29,6	18,7 19,9
	1	86	49,5	31,4	19,1
Mittelwert für alle Trennungen (± Standardabweichung)			55,3 ± 4,3	27,8 ± 4,4	16,8 ± 5,1

für N7-ÄG in Gehirn-DNS in Tab. 8 u. 9).

N7-ÄA ließ sich nur bei wenigen Trennungen quantitativ auswerten, da die ^{14}C-Aktivität im Bereich des optischen N7-ÄA-Peaks meist nicht über dem doppelten Background lag. In den wenigen Fällen, in denen es berechnet wurde, machte es nicht mehr als 3 % der gebildeten Äthylpurinbasen aus.

Die bei in vitro-Äthylierung von Rattenleber-DNS beobachteten, nicht identifizierten radioaktiven Peaks traten auch bei diesen Trennungen auf, allerdings weniger ausgeprägt, da für die Trennungen weniger Material und somit eine geringere ^{14}C-Aktivität zur Verfügung stand.

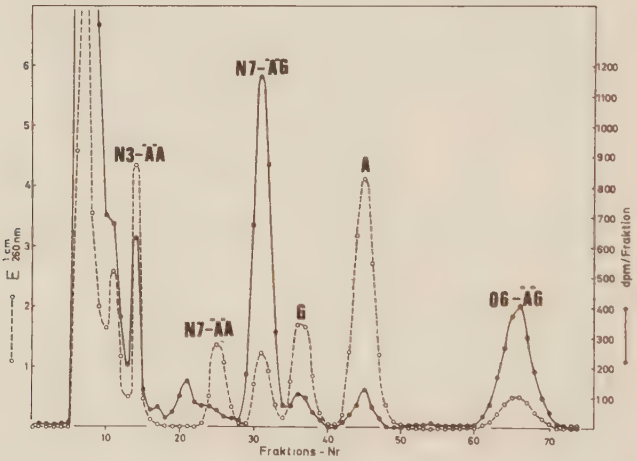


Abb. 6: Radiochromatogramm eines DNS-Hydrolysates aus Gehirnen 10 Tage alter Ratten, 4 h nach einer einmaligen i.p. Applikation von 75 µg ^{14}C-ÄNH/g Kgw. Trennung über eine Sephadex G10-Säule nach Zugabe von nicht-radioaktivem N3-ÄA, N7-ÄA, N7-ÄG und O6-ÄG.

Der im Anfangspeak eluierte Anteil der ^{14}C-Aktivität des gesamten Gradienten war noch höher als bei den in vitro-Versuchen. Er lag im Mittel bei 79 % und betrug bei einigen Trennungen bis zu 97 %.

Abb. 6 zeigt als Beispiel ein Radiochromatogramm von DNS aus dem Gehirn 10 Tage alter Ratten, 4 h nach ÄNH-Applikation.

Die molaren Anteile der gebildeten Äthylpurinbasen an der Gesamtmenge der entsprechenden Basen nach ÄNH-Puls sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10:

Bildung von N7-ÄG, O 6-ÄG, N3-ÄA in der DNS verschiedener Rattengewebe, 1 h nach einmaliger Applikation von 75 µg ^{14}C-ÄNH/g Kgw, angegeben als molare Anteile der entsprechenden Purinbasen.

Gewebe	$\frac{N7\text{-}ÄG}{G}$ (x 10^5)	$\frac{O6\text{-}ÄG}{G}$ (x 10^5)	$\frac{N3\text{-}ÄA}{A}$ (x 10^5)
Leber, adult	3,9	1,7	0,8
Gehirn, adult	1,5	0,9	0,6
Leber, Tiere 10 Tage alt	3,4 x	1,6 x	0,9 x
Gehirn, Tiere 10 Tage alt	2,2 x	1,2 x	0,5 x
Rest-Gewebe, Tiere 10 Tage alt	2,8 x	1,6 x	0,4 x
Ganzer Foet, 18. Tag d.Gravidität	1,7	1,2	0,4

x Mittelwerte für die DNS-Basentrennungen von Geweben, die 1 h und 4 h nach ÄNH-Applikation aufgearbeitet wurden.

Während die relativen Anteile der 3 gebildeten Äthylpurinbasen in den verschiedenen Geweben sehr ähnlich sind, treten bei den Absolutwerten gewisse Unterschiede auf. Wie bereits unter 3.1.2.1 festgestellt, ist der Äthylierungsgrad in der Leber adulter wie auch 10 Tage alter Tiere am

höchsten. Dies ist wahrscheinlich durch die wegen der kurzen Lebenszeit des ÄNH nicht ganz gleichmäßige Verteilung des Cancerogens im Organismus der Ratte zu erklären (48). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, daß der Grad der initialen Äthylierung der DNS durch ÄNH die Spezifität des Cancerogens für das zentrale und periphere Nervensystem nicht erklären kann.

In der RNS von ÄNH-behandelten Rattengeweben scheint N7-ÄG das vorwiegend gebildete Reaktionsprodukt zu sein. N7-ÄA und N3-ÄA waren nicht nachweisbar (vgl. Abb. 5a und 5c).

Allerdings konnte das Vorkommen von O6-ÄG nicht untersucht werden, da RNS unter Hydrolysebedingungen, bei denen das O6-ÄG stabil bleibt, nicht gespalten wird und eine enzymatische Hydrolyse nur bis zu den Nucleosiden möglich ist, für die wiederum keine Marker zur Verfügung standen.

Ergänzend sind in Tabelle 11 die Werte für die Aktivitätsverteilung im Gradienten nach in vitro- und in vivo-Äthylierung von Rattenleber-DNS durch ÄNH mit denen nach Äthylierung durch DÄNA einander gegenübergestellt.

Tabelle 11:

^{14}C-Aktivitätsverteilung auf die einzelnen Äthylpurinbasen von Rattenleber-DNS nach in vitro- oder in vivo-Äthylierung mit ^{14}C-ÄNH oder ^{14}C-DÄNA.

	N7-ÄG	O6-ÄG	N3-ÄA
ÄNH, in vitro	48	30	23
ÄNH, in vivo	56	25	18
DÄNA, in vivo	66	14	20

Ein deutlicher Unterschied zwischen dem Ausmaß der Äthylierung durch DÄNA oder ÄNH ist für den Anteil des gebildeten O6-ÄG festzustellen. Er ist in mit ÄNH äthylierter DNS etwa doppelt so groß wie in DÄNA-äthylierter DNS.

3.1.2.3. Äthylierungsausbeuten bei verschiedenen proliferativen Zuständen eines Gewebes

Es gibt Hinweise dafür, daß die Wirkung eines Cancerogens u.a. vom jeweiligen proliferativen Zustand eines Gewebes abhängig ist (87, 104). Es war daher die Frage zu prüfen, ob nicht die Nucleinsäuren bei verschiedenen proliferativen Zuständen des gleichen Gewebes in unterschiedlichem Ausmaß alkyliert werden. So wäre es denkbar, daß die DNS während der Replikation für eine Reaktion mit dem Cancerogen besser zugänglich ist.

3.1.2.3.1. Gesteigerte DNS-Synthese in der Leber nach Teilhepatektomie

Die Äthylierung der DNS durch ÄNH bei gesteigerter DNS-Synthese wurde am System der regenerierenden Rattenleber nach partieller Hepatektomie untersucht. Bekanntlich ist die DNS-Synthese etwa 24 h nach partieller Hepatektomie stark gesteigert (12). Weiter unterliegt der Anteil DNS-synthetisierender Leberparenchymzellen tageszeitlichen Schwankungen, die bis zu einem Faktor 3 betragen können (34). Die höchsten Werte werden zwischen 2.00 und 4.00 h nachts erreicht (34). Die Tiere wurden daher um 2.00 h nachts teilhepatektomiert. Eine erste Versuchsgruppe erhielt 11 h nach Teilhepatektomie, also während der präreplikativen Periode, eine Dosis von 75 µg ^{14}C-ÄNH/g Kgw., eine zweite Versuchsgruppe erhielt die gleiche Dosis 24 h nach Teilhepatektomie, also wieder um 2.00 h nachts, zum Zeitpunkt einer stark erhöhten DNS-Syntheserate in der Restleber.

a) Berechnung der relativen DNS-Syntheserate 11 h und 24 h nach Teilhepatektomie

Die DNS-Syntheserate wurde durch Einbau von ^{3}H-Tdr gemessen. Thymidin wird im Dowex-Ionenaustauscherchromatogramm der mit 1 N HCl hydrolysierten DNS gleich beim Start der Elution als Nucleotid eluiert (siehe 2.11.1.). Die ^{3}H-Aktivi-

tät pro mg Leber-DNS in diesem Bereich betrug 11 h nach Teilhepatektomie 69 cpm, 24 h nach der Leber-Teilresektion 1212 cpm. Die DNS-Syntheserate war demnach 24 h nach partieller Hepatektomie im Vergleich zum Zeitpunkt 11 h um den Faktor 17,5 gesteigert.

b) Äthylierung am N7 des Guanins in den Nucleinsäuren der teilhepatektomierten Tiere 1 h nach ^{14}C-ÄNH-Gabe

Abb. 7 zeigt das Radiochromatogramm der Leber-DNS 25 h nach Teilhepatektomie. Neben dem Aktivitätspeak des N7-ÄG und dem kleineren des N3-ÄG sind weitere im Bereich der Purine zu beobachten. Verglichen mit der normalen adulten Leber ist die ^{14}C-Aktivität in den Purinbasen hier als Folge der erhöhten DNS-Syntheserate erheblich gesteigert.

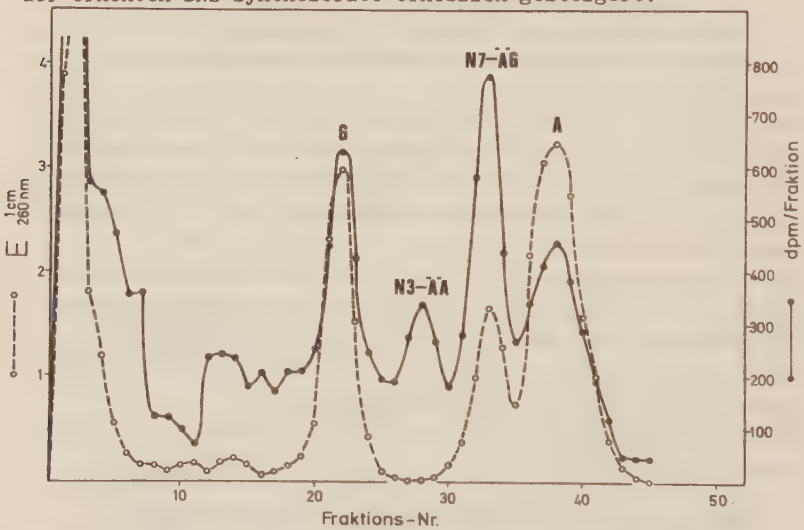


Abb. 7: Ionenaustauscher-Radiochromatogramm einer Rattenleber-DNS, 25 h nach 2/3-Hepatektomie und 1 h nach Applikation von 75 µg ^{14}C-ÄNH/g Kgw. Nach Hydrolyse der DNS in 1 N HCl für 1 h bei 100°C und Zugabe von nicht-radioaktivem N7-ÄG als Marker wurden die Basen mit einem exponentiellen HCl-Gradienten über eine Dowex 50 WX12-Säule getrennt.

Der molare Anteil des N7-ÄG am Gesamtguanin hingegen ist in DNS und RNS 12 h und 25 h nach partieller Hepatektomie gleich groß. Es ist interessant, daß die N7-ÄG-Werte für DNS nach Teilhepatektomie nur etwa halb so hoch liegen wie in der intakten adulten Leber-DNS. Eine Deutung erscheint hier jedoch schwierig, da Unterschiede hinsichtlich Durchblutung und Stoffwechselaktivität zwischen regenerierender und normaler Leber verschiedene Voraussetzungen schaffen. Eine unterschiedliche Äthylierungsausbeute für DNS-Guanin in Position N-7 bei hoher und niedriger DNS-Syntheserate der Leber zum Zeitpunkt des Carcinogen-Pulses liegt jedenfalls nicht vor.

Tabelle 12:

Molarer N7-ÄG-Anteil in den Nucleinsäuren der adulten Rattenleber 1 h nach Applikation von 75 µg ^{14}C-ÄNH/g Kgw. zu verschiedenen Zeitpunkten nach partieller Hepatektomie. Die für normale, nicht operierte Tiere gefundenen Werte sind zum Vergleich aufgeführt.

	N7-ÄG/$_G$ (x 10^5)	
	DNS	RNS
Leber, intakt	3,5	1,4
Leber, 12 h nach partieller Hepatektomie	1,4	1,5
Leber, 25 h nach partieller Hepatektomie	1,4	1,5

3.1.2.3.2. Gehemmte DNS-Synthese in der foetalen Ratte nach Applikation von Hydroxyharnstoff

In Umkehrung zu 3.1.2.3.1 wurde untersucht, ob eine Hemmung der DNS-Synthese den Grad der Äthylierung der Nucleinsäuren durch ÄNH beeinflußt. Als DNS-Synthese-Inhibitor wurde Hydroxyharnstoff (HU) (107) verwendet. Bei Gabe von 500 µg HU/g Kgw. an gravide Ratten am 18. Tag der Gravidität ist die DNS-Synthese im Foetus bis zu 4 h nach HU-Applikation fast vollständig blockiert ((88), vgl. Abb. 8).

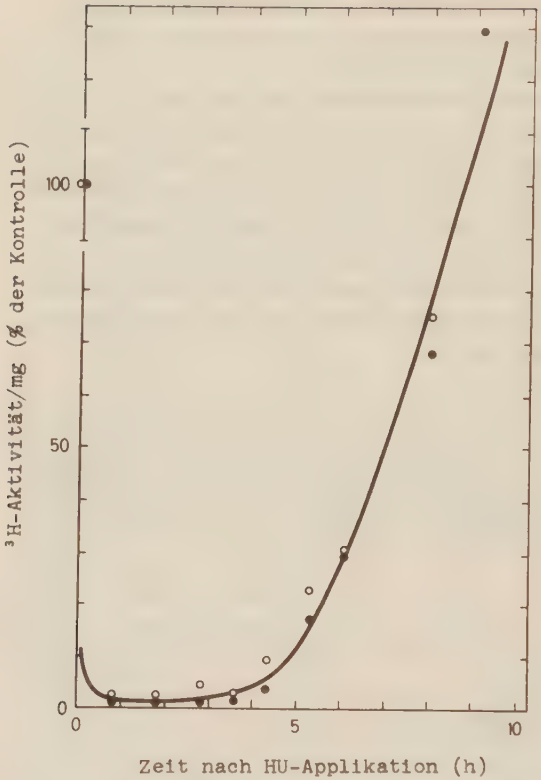


Abb. 8: (siehe (188)) DNS-Synthese in 18 Tage alten BD IX-Ratten-Foeten nach Puls-Applikation von 0,5 mg HU /g Kgw. an das Muttertier, gemessen als ^{3}H-Tdr-Einbau/mg Gewebe

- ● ^{3}H-Aktivität/mg Trockengewicht (% des Kontrollwertes
- o autoradiographische Messung ^{3}H-Aktivität/10 µ Mikrotomschnitt (% des Kontrollwertes).

Jeder Punkt ist ein Mittelwert aus 2-8 Foeten.

Es zeigte sich, daß der Grad der Äthylierung der foetalen Nucleinsäuren durch ÄNH während eines Blocks der DNS-Synthese durch HU sich nicht von demjenigen bei intakter DNS-Synthese unterscheidet (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13:

Äthylierungsausbeuten in den Nucleinsäuren von 18-Tage-Foeten, 1 h nach transplacentarer Applikation von 75 µg ^{14}C-ÄNH/g Kgw. unter den Bedingungen

a) einer intakten DNS-Synthese,

b) einer gehemmten DNS-Synthese (durch i.p.Applikation von 500µg HU/g Kgw. an die Mütter 1 h vor dem ÄNH-Puls)

	RNS	DNS		
	N7-ÄG/$_G$ ($x10^5$)	N7-ÄG/$_G$ ($x10^5$)	O6-ÄG/$_G$ ($x10^5$)	N3-ÄA/$_A$ ($x10^5$)
a) Foetus (intakte DNS-Synthese)	0,6	1,7	1,1	0,4
b) Foetus (HU-blockierte DNS-Synthese)	0,7	1,6	0,8	0,4

3.2. Kinetische Betrachtung des Gehalts der Nucleinsäuren an äthylierten Purinbasen

3.2.1. Stabilität äthylierter Purinbasen in der DNS in vitro

Die Stabilität der äthylierten Purinbasen in der DNS wurde in folgender Weise geprüft:

In vitro äthylierte Rattenleber-DNS wurde in verdünntem SSC-Puffer, pH 7, gelöst, 2 h im Wasserbad auf 100°C erhitzt, 48 h dialysiert, dann gefällt und anschließend hydrolysiert. Das Aktivitätsprofil, das sich nach Trennung des Hydrolysates über eine Sephadex G10-Säule ergibt, wurde mit

dem von nicht erhitzter in vitro äthylierter DNS verglichen (Abb. 9). Die ^{14}C-Aktivität im N7-ÄG, N3-ÄA- und N7-ÄA-Peak war nach dem zweistündigen Erhitzen völlig verloren gegangen. Dagegen blieb sie im O6-ÄG-Peak fast vollständig erhalten.

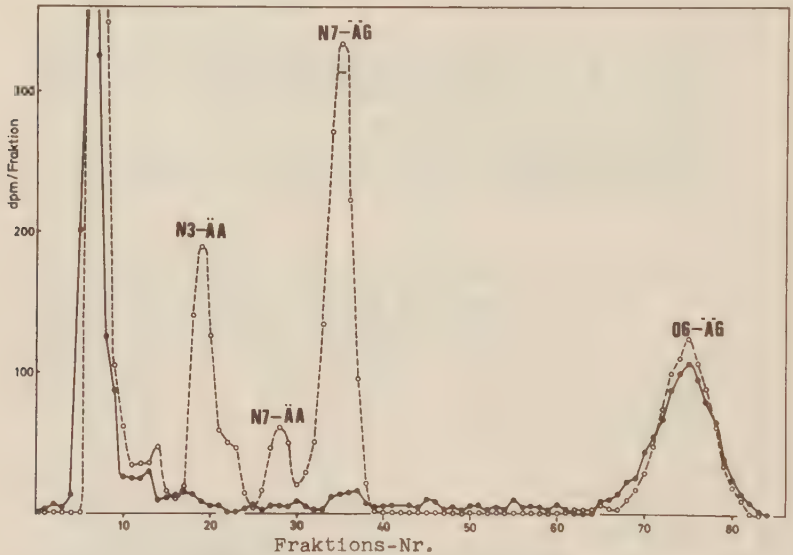


Abb. 9: Vergleich der Aktivitätsprofile von mit ^{14}C-ÄNH äthylierter DNS, die vor Hydrolyse in 0,1 N HCl für 2 h bei pH 7 auf 100°C erhitzt worden war (●-●-●), und nur in 0,1 N HCl hydrolysierter DNS (o-o-o)nach Trennung der Hydrolysate über eine Sephadex G 10-Säule.
Zum besseren Vergleich wurde die ^{14}C-Aktivität pro µMol Guanin der eingesetzten DNS-Menge angegeben.

Während also durch Äthylierung an einem Ringstickstoff der Purinbasen die N-glykosidische Bindung sehr labil wird, bleibt sie nach Äthylierung am O6 des Guanins stabil.

Zur Beurteilung der an der in vivo-Eliminierung äthylierter Basen aus der DNS beteiligten Mechanismen wurde die Ausscheidungsrate der äthylierten Purinbasen aus der DNS in vitro bei 37°C bestimmt.

Aus "Rest-Gewebe" 10 Tage alter, ÄNH-behandelter Ratten isolierte DNS wurde in Phosphat-Puffer, pH 7,2, bei 37° inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen, die DNS gefällt, mehrmals gewaschen und anschließend die Anteile der äthylierten Purinbasen bestimmt.

Aus den in Tabelle 14 aufgeführten Werten wurden die Halbwertszeiten ($T_{1/2}$) für den Gehalt der äthylierten Basen in der DNS berechnet. Dabei ergab sich für N7-ÄG $T_{1/2}$=225 h, für N3-ÄA $T_{1/2}$ = 33 h. Dagegen scheint O6-ÄG völlig stabil zu sein. Auch die im "Anfangspeak" eluierte Aktivität blieb unverändert.

Tabelle 14:

Elimination von Äthylpurinbasen aus DNS in vitro bei 37°C.

Inkubations-Dauer (h)	$\frac{\text{N7-ÄG}}{\text{G}}$ (x 10^5)	$\frac{\text{O6-ÄG}}{\text{G}}$ (x 10^5)	$\frac{\text{N3-ÄA}}{\text{A}}$ (x 10^5)
0	2,69	1,55	0,42
10			0,34
68	2,19	1,54	- x
240	1,25	1,58	- x

x unter der Nachweisgrenze

3.2.2. Eliminierung von N7-Äthylguanin in vivo aus den Nucleinsäuren der Rattenleber nach einmaliger Applikation von N,N-Diäthyl-1-^{14}C-nitrosamin

Nach der Charakterisierung der chemischen Stabilität äthylierter Purinbasen in der DNS schien es wichtig, die Elimination der äthylierten Basen aus der DNS unter in vivo-Bedingungen zu untersuchen und die Frage zu prüfen, ob neben einer hydrolytischen Abspaltung aus der DNS der Zelle auch aktive, d.h. enzymatische Mechanismen zur Verfügung stehen, die eine Elimination chemisch veränderter Ba-

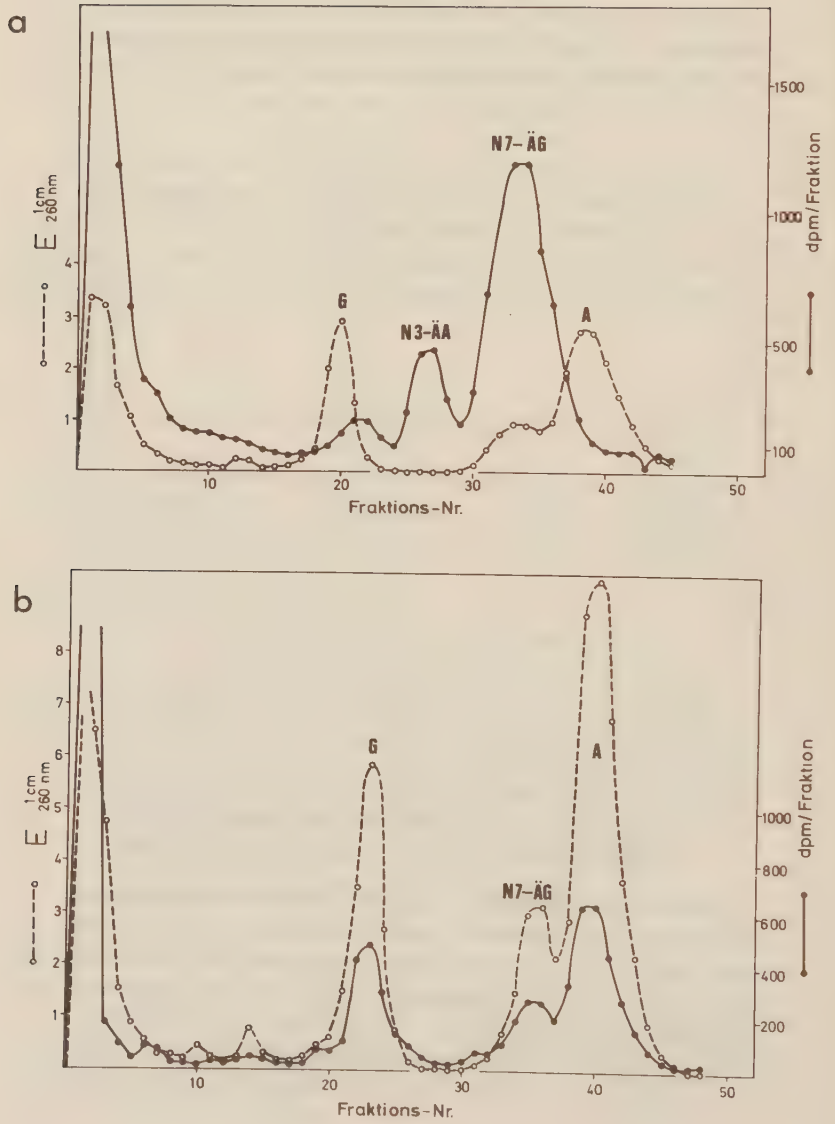

a
E 1cm 260 nm
dpm/Fraktion
G
N3-ÄA
N7-ÄG
A
Fraktions-Nr.
b
E 1cm 260 nm
dpm/Fraktion
G
A
N7-ÄG
Fraktions-Nr.

Abb. 10: Ionenaustauscher-Radiochromatogramme von Rattenleber-DNS

a) 3 h ,

b) 240 h nach einmaliger oraler Applikation von 10 µg ^{14}C-DÄNA/g Kgw.

Die DNS wurde in 1 N HCl für 1 h bei 100° C hydrolysiert und die Basen nach Zugabe von nicht-radioaktivem N7-ÄG als Marker mit einem exponentiellen HCl-Gradienten über eine Dowex 50 WX 12-Säule getrennt.

sen ermöglichen. Es wurde daher der N7-ÄG-Gehalt in den Nucleinsäuren der adulten Rattenleber als Funktion der Zeit bestimmt, und zwar zunächst nach Applikation des Lebercarcinogens DÄNA.

Das ^{14}C-DÄNA-Präparat wurde in einer Dosierung von 10 µg /g Kgw. oral mittels Schlundsonde an adulte männliche Ratten appliziert. Nach verschiedenen Zeiten(2 - 240 h) wurden die Lebern entnommen und die Nucleinsäuren sowie das Protein isoliert. Für jeden Zeitpunkt wurden die Lebern von 3 Tieren gepoolt. Die spezifische ^{14}C-Aktivität der DNS-, RNS- und Proteinpräparationen und der N7-ÄG-Gehalt von RNS und DNS wurden bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15:

Spezifische ^{14}C-Aktivität von Leber-DNS, -RNS und -Protein, sowie N7-ÄG/GWerte für DNS und RNS als Funktion der Zeit nach oraler Applikation von 10 µg ^{14}C-DÄNA/g Kgw. an adulte männliche Ratten.

Zeit nach Applikation von ^{14}C-DÄNA (h)	Spez. ^{14}C-Aktivität(dpm/mg) (x 10^{-3}) in			N7-ÄG/G (x10^{5}) in	
	DNS	RNS	Protein	DNS	RNS
2		2,6		2,9	1,0
3[x]	2,9	2,6	3,5	3,9	2,8
5,5		3,1	5,1	3,3	
12[x]		7,7	4,6	2,3	2,3
24[x]		3,1	3,5	1,2	1,3
30		2,1		1,0	
47		1,9	2,5	1,0	1,2
73		2,2	1,8	0,6	0,9
114		1,4	1,3	0,6	0,6
240	2,4	1,4	0,5	0,3	0,2

[x]Bei diesen Zeitpunkten wurden Ergebnisse aus einer von Dipl.biochem. OBERBARNSCHEIDT in unserem Laboratorium angefertigten Diplomarbeit einbezogen (81).

In Abb. 10a u. b sind die Radiochromatogramme von 3 h und 240 h nach DANA-Applikation isolierter Leber-DNS einander gegenübergestellt. Während bei der 3 h-DNS der größte Anteil der ^{14}C-Aktivität dem N7-ÄG zuzuordnen ist, erscheint in der 240 h-DNS ein Großteil der ^{14}C-Aktivität in den Purinbasen, dagegen ist der N7-ÄG-Peak stark reduziert.

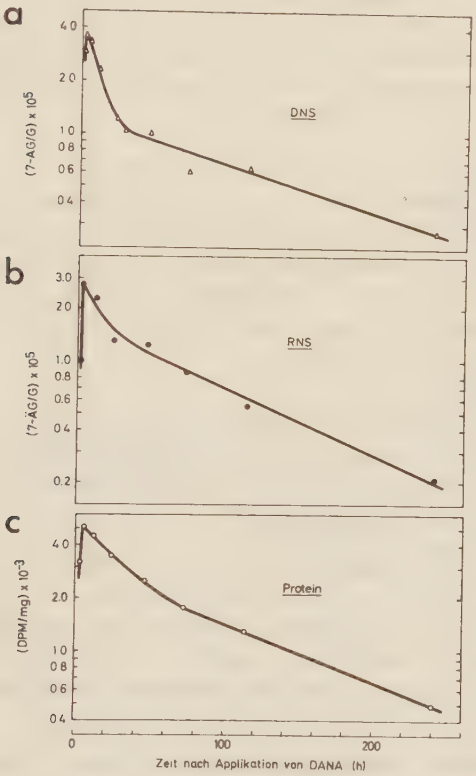


Abb. 11: Zeitliche Abnahme des N7-Äthylguanin-Gehaltes
a) der DNS,
b) der RNS aus Rattenleber nach einmaliger oraler Applikation von ^{14}C-DANA (10 µg/g Kgw.),
c) zeitliche Abnahme der spezifischen ^{14}C-Aktivität des Leberproteins.

In Abb. 11 ist die zeitliche Abnahme des N7-ÄG-Gehaltes in den Lebernucleinsäuren dargestellt. Die Kurven zeigen einen raschen Anstieg mit einem Maximum bei 3 h nach Applikation des Cancerogens. Der Abfall erfolgt zunächst steil, dann mit einer langsameren Komponente. In der DNS ist der N7-ÄG/G-Wert 21 h nach der maximalen Alkylierung (bei 3 h nach Applikation des Cancerogens) bereits auf 31 % gesunken und fällt dann bis 240 h auf 7,7 %. In der RNS fällt der N7-ÄG-Gehalt gleichmäßiger, 24 h nach DÄNA-Applikation ist er auf 46 % des Maximalwertes bei 3 h abgefallen, 240 h danach auf 7 %.

Für die langsame Komponente der Kurve ergibt sich für die DNS eine Halbwertszeit von $T_{1/2}$ = 110 h, für die RNS von $T_{1/2}$ = 80 h. Zum Vergleich mit der Abnahme des ÄG-Gehaltes der Lebernucleinsäuren ist in Abb. 11c die Abnahme der spezifischen ^{14}C-Aktivität des Leberproteins dargestellt. Sie erfolgt nach einem etwas steileren Beginn mit einer Halbwertszeit von $T_{1/2}$ = 90 h.

3.2.3. Eliminationsraten verschiedener äthylierter Purinbasen in vivo aus den Nucleinsäuren von Leber und Gehirn 10 Tage alter Ratten nach Puls-Applikation von ^{14}C-Äthylnitrosoharnstoff

10 Tage alten Ratten wurde eine einmalige Dosis von 75 µg ^{14}C-ÄNH i.p. appliziert und zu verschiedenen Zeiten (1 h, 4 h, 25 h, 114 h und 240 h) nach dem Cancerogen-Puls aus Gehirn und Leber die Nucleinsäuren und Proteine isoliert. Für die verschiedenen Zeitpunkte wurden die entsprechenden Gewebe von jeweils 35, 36, 51, 72 und 75 Tieren vereinigt.

In Abb. 12 ist die spezifische ^{14}C-Aktivität der Präparationen als Funktion der Zeit nach dem ^{14}C-ÄNH-Puls wiedergegeben. Während im Falle der Proteine ein maximaler Wert bereits bei dem 4 h-Zeitpunkt erreicht ist und im Verlauf der folgenden 110 h ziemlich steil abfällt, sind die Werte für DNS und RNS erst beim 25 h-Zeitpunkt am höchsten und fallen

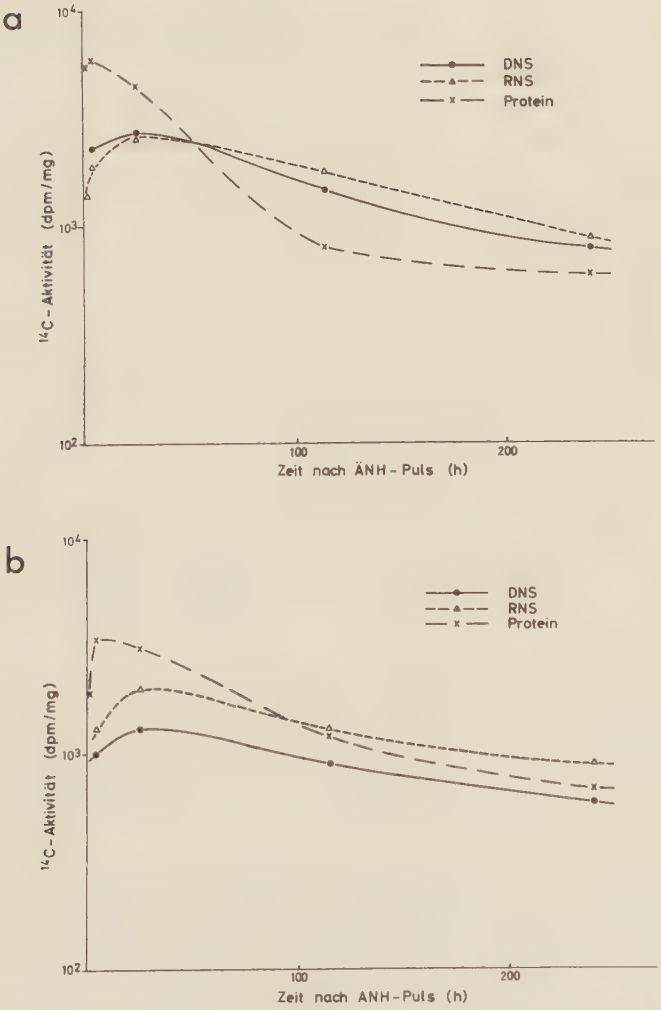


Abb. 12: Zeitliche Abnahme der spezifischen ^{14}C-Aktivität von DNS, RNS und Protein nach einem ^{14}C-ÄNH-Puls bei 10 Tage alten Ratten
a) Leber b) Gehirn

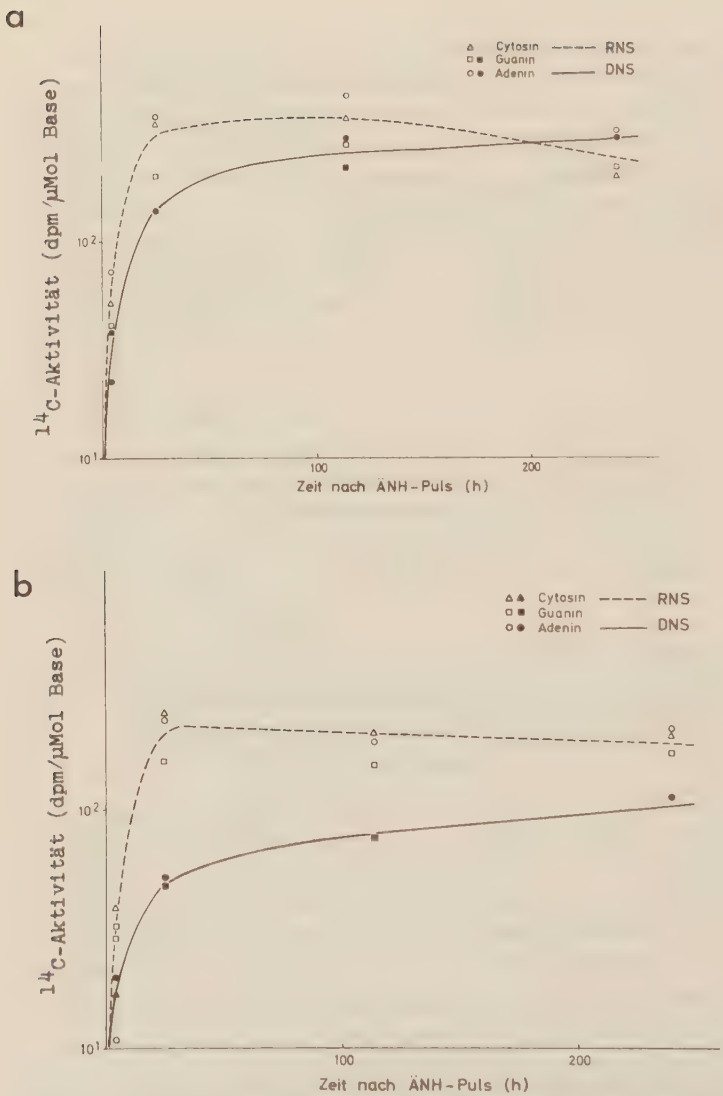


Abb. 13: Metabolische ^{14}C-Markierung der Basen von RNS (offene Symbole) und DNS (ausgefüllte Symbole) über den ^{14}C -Stoffwechsel als Funktion der Zeit nach einem ^{14}C-ÄNH-Puls bei 10 Tage alten Ratten
a) Leber b) Gehirn

dann, entsprechend einer Kinetik erster Ordnung, gleichmäßig bis zum 240 h-Zeitpunkt ab. Daß es sich jedoch nur scheinbar um eine Kinetik dieses Typs handelt, geht daraus hervor, daß in die Meßwerte für die spez. ^{14}C-Aktivität von DNS und RNS neben der Elimination äthylierter Basen auch der Einbau von ^{14}C in die Basen mit eingeht. Diese über den C2-Stoffwechsel in die Nucleinsäurebasen eingebaute ^{14}C-Aktivität ist in Abb. 13 als Funktion der Zeit aufgetragen. Sie steigt in den ersten 25 h steil an und bleibt dann mehr oder weniger auf einem Plateau, im Falle der DNS noch leicht ansteigend, im Falle der RNS langsam abfallend. Ähnliche Kurven wurden nach Applikation von ^{14}C-DMN bei adulten Ratten für den ^{14}C-Einbau in die Purinbasen in Leber-RNS (75) und -DNS (83) gemessen. Hier war jedoch die metabolische ^{14}C-Markierung der DNS (angegeben als dpm/µMol Base)um den Faktor 5-6 niedriger als diejenige der r-RNS, während im vorliegenden Versuch sowohl in der Leber als auch im Gehirn die metabolische Markierung der DNS ganz ähnlich der der RNS ist, was auf die höhere proliferative Aktivität der Gewebe 10 Tage alter Ratten zurückzuführen ist.

Nach einem ÄNH-Puls scheint der maximale Äthylierungsgrad in den Nucleinsäuren bereits nach 1 h erreicht zu sein (Ausnahme N7-ÄG/G in Gehirn-RNS, maximaler Wert bei 25 h). Unterschiede zwischen dem 1 h und 4 h Zeitpunkt werden auf die Meßgenauigkeit der Tierversuche und Bestimmungsmethoden zurückgeführt.

Die in vitro-Untersuchungen hatten gezeigt, daß N3-ÄA und N7-ÄG aus der DNS hydrolytisch abgespalten werden, während sich der O6-ÄG-Gehalt der DNS über einen Zeitraum von 240 h nicht änderte; ebenso blieb die spez. ^{14}C-Aktivität des "Anfangspeaks" (siehe S.50) erhalten. In der vorliegenden Versuchsreihe wurden nunmehr die in vivo-Eliminationsraten der verschiedenen Äthylpurinbasen aus der DNS bestimmt, und zwar vergleichsweise in Gehirn ("target-Gewebe" für die cancerogene Wirkung des ÄNH) und Leber ("Nicht-Target-Gewebe"). Hierzu wurden die molaren Anteile von N7-ÄG, O6-ÄG und

N3-ÄA in der DNS sowie die ^{14}C-Aktivität im "Anfangspeak" als Funktion der Zeit nach ^{14}C-ÄNH-Puls bestimmt (siehe Tabelle 16). Für die Zeitpunkte 1 h, 4 h und 240 h wurden

Tabelle 16:

Molare Anteile der äthylierten Purinbasen N7-ÄG, O6-ÄG und N3-ÄA in der DNS verschiedener Gewebe als Funktion der Zeit nach einem i.p. Puls von 75 µg ^{14}C-ÄNH/g Kgw. bei 10 Tage alten Ratten (gemessen nach Hydrolyse der DNS in 0,1 N HCl und Trennung des Hydrolysates über eine Sephadex G 10-Säule). Zusätzlich ist die ^{14}C-Aktivität im "Anfangspeak" zu den verschiedenen Zeiten und das jeweilige Verhältnis von O6-ÄG zu N7-ÄG angegeben.

	Zeit nach ÄNH-Puls (h)				
	1	4	25	114	240
	N7-ÄG/G (x 10^5)				
Gehirn	2,35	2,03	2,01	0,81	0,37
Leber	3,20	3,58	2,82	1,50	0,31
"Rest-Gewebe"	2,81	2,69	- x	- x	0,19
	O6-ÄG/G (x 10^5)				
Gehirn	1,05	1,25	0,79	0,56	0,40
Leber	1,65	1,58	0,33	0,05	- xx
"Rest-Gewebe"	1,58	1,55	- x	- x	0,08
	N3-ÄA/A (x 10^5)				
Gehirn	0,46	0,28	0,14	- xx	- xx
Leber	0,94	0,45	0,19	- xx	- xx
"Rest-Gewebe"	0,36	0,42	- x	- x	- xx
	^{14}C-Akt. im Anfangspeak (dpm/mg einges.DNS)				
Gehirn	270	646	870	755	246
Leber	860	1951	2200	1057	474
"Rest-Gewebe"	2724	3700	- x	- x	312
	(O6-ÄG/G)/(N7-ÄG/G)%				
Gehirn	44,7	61,6	39,9	69,1	108,1
Leber	51,6	44,1	11,7	3,3	-
"Rest-Gewebe"	56,2	57,2	-	-	40,5

x nicht gemessen
xx unter der Nachweisgrenze

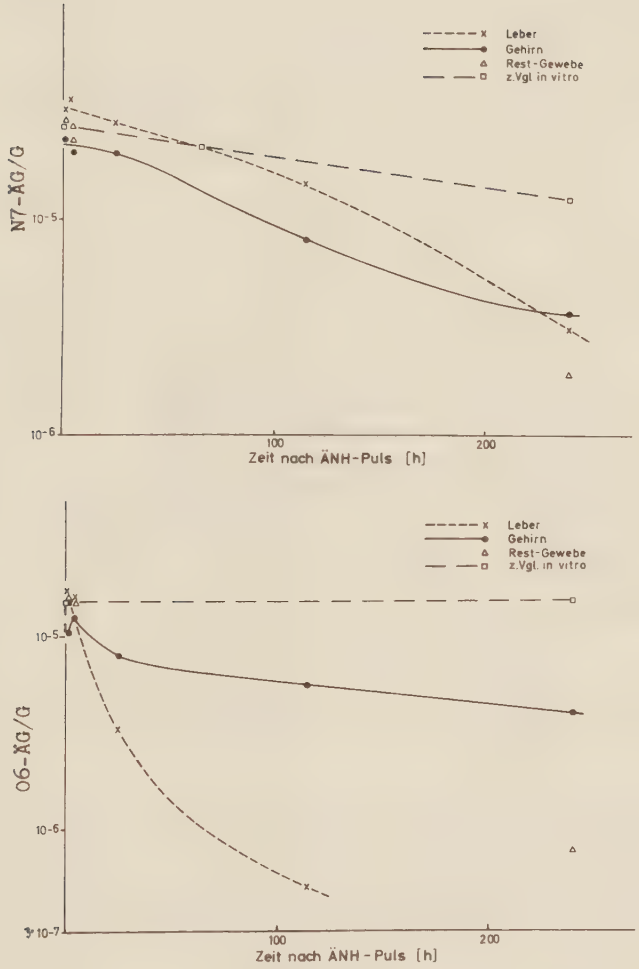


Abb. 14: Zeitliche Abnahme des Gehalts von a) N7-ÄG und b) O6-ÄG der DNS in verschiedenen Geweben nach einem ^{14}C-ÄNH-Puls bei 10 Tage alten Ratten. Zum Vergleich sind die entsprechenden Kurven für in vitro inkubierte DNS (aus "Rest-Gewebe" isoliert) angegeben.

zusätzlich zu den Werten für Leber und Gehirn die Werte für "Rest-Gewebe" (vereinigte Gewebe von Lunge, Niere, Dünndarm, Milz und Muskeln) bestimmt.

Die zeitliche Abnahme des N7-ÄG- und O6-ÄG-Gehaltes in Leber- und Gehirn-DNS in vivo (und zum Vergleich in DNS bei in vitro-Inkubation) ist in Abb. 14 gezeigt.

Während die jeweiligen Eliminationsraten für N7-ÄG und N3-ÄA aus Gehirn- und Leber-DNS ähnlich sind, ergab sich für O6-ÄG ein erheblicher Unterschied. Im Gegensatz zu Leber-DNS ist im Falle der Gehirn-DNS die Eliminationsrate von O6-ÄG wesentlich langsamer als diejenige von N7-ÄG. Der O6-ÄG/G-Wert in Gehirn-DNS betrug anfangs nur 65 % des Wertes für Leber-DNS, bei 114 h war er dagegen bereits um etwa den Faktor 11 höher und betrug bei 240 h immer noch 21 % des Anfangswertes, während in Leber-DNS zu diesem Zeitpunkt O6-ÄG nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Abb. 15 zeigt das Gehirn/Leber-Verhältnis des O6-ÄG und N7-ÄG-Gehaltes der DNS als Funktion der Zeit nach dem ÄNH-

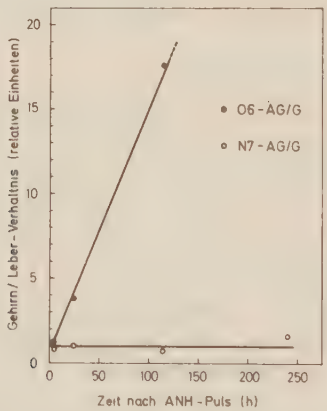


Abb. 15: Gehirn/Leber-Verhältnis des Gehalts von O6-ÄG und N7-ÄG in DNS als Funktion der Zeit nach einem ^{14}C-ÄNH-Puls bei 10 Tage alten Ratten

Tabelle 17:

Molarer Anteil von N7-ÄG in RNS als Funktion der Zeit nach einem i.p.Puls von 75 µg ^{14}C-ÄNH/g Kgw. bei 10 Tage alten Ratten (gemessen nach Hydrolyse der RNS in 1 N HCl oder 70 % $HClO_4$ für 1 h bei 100°C und anschließender Trennung des Hydrolysats über eine Dowex 50 H^+-Säule mit exponentiellem HCl-Gradienten).

	Zeit nach ÄNH-Puls (h)				
	1	4	25	114	240
	N7-ÄG/G ($\times 10^5$)				
Gehirn	0,79	0,91	0,98	0,33	0,17
Leber	2,42	1,88	1,85	0,84	0,17
"Rest-Gewebe"	1,21	1,08			0,12
	Spez.^{14}C-Aktivität im Anfangspeak (dpm/mg einges. RNS)				
Gehirn	855	591	1320	629	357
Leber	800	1110	1620	846	209
"Rest-Gewebe"	1372	2241			234

Puls. Während dieses Verhältnis für N7-ÄG/G etwa konstant bleibt, ist im Falle des O6-ÄG/G-Wertes ein starker Anstieg zu verzeichnen. Der molare O6-ÄG-Gehalt der Leber-DNS nimmt ähnlich schnell ab wie der von N3-ÄA in allen Geweben. Doch wurde N3-ÄA auch in vitro sehr schnell aus der DNS eliminiert, während O6-ÄG unter in vitro-Bedingungen stabil war.

Die ^{14}C-Aktivität im "Anfangspeak" steigt bis zum 25h-Zeitwert an. Wahrscheinlich wird hierbei neben den entstandenen ^{14}C-Äthylphosphatestern noch die in die Pyrimidinbasen eingebaute ^{14}C-Aktivität gemessen, da diese ebenfalls gleich zu Beginn eluiert werden.

Die Elimination von N7-ÄG aus RNS ist in Abb. 16 dargestellt. Die entsprechenden Meßwerte sind zusammen mit der zeitlichen Veränderung der spez.^{14}C-Aktivität des "Anfangspeaks" in Tabelle 17 aufgeführt.

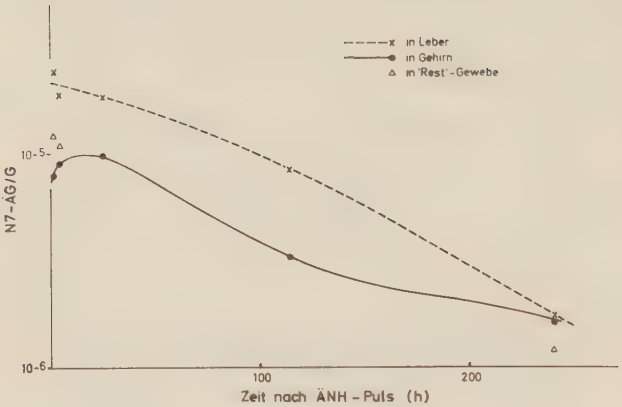


Abb. 16: Zeitliche Abnahme des N7-ÄG-Gehalts der RNS aus Leber und Gehirn nach einem ^{14}C-ÄNH-Puls bei 10 Tage alten Ratten

In Tabelle 18 sind die Halbwertszeiten ($T_{1/2}$) des Äthylpurinbasen-Gehalts der Nucleinsäuren sowie der Abnahme der spez. ^{14}C-Aktivität des "Anfangspeaks" für DNS und RNS aus den untersuchten Geweben zusammengestellt. Dabei ergeben sich für die Eliminationsraten des N7-ÄG, N3-ÄA und die Abnahme der spez. ^{14}C-Aktivität des "Anfangspeaks" jeweils sehr ähnliche $T_{1/2}$-Werte, die im Gehirn jeweils am höchsten, in "Rest-Gewebe" am niedrigsten sind. Einen extrem starken Unterschied zwischen den Geweben findet man nur für die Abnahme des O6-ÄG-Gehalts der DNS, welche im Gehirn je nach Berechnungsmodus (siehe Tabelle 18) um den Faktor 9 (a) bzw. 6 (b) langsamer ist als in der Leber und um mehr als den Faktor 3 langsamer als in "Rest-Gewebe".

Tabelle 18:

Halbwertszeiten ($T_{1/2}$) für den Äthylpurinbasen-Gehalt der Nucleinsäuren von Leber, Gehirn und "Rest-Gewebe" 10 Tage alter Ratten nach einem ^{14}C-ÄNH-Puls, sowie für die Abnahme der spez. ^{14}C-Aktivität des "Anfangspeaks". Die $T_{1/2}$-Werte wurden durch Regressionsanalyse der Meßwerte bestimmt.
a) Berücksichtigung aller Meßwerte bei der Berechnung der Geraden,
b) Berücksichtigung der Meßwerte erst ab dem 25 h-Zeitpunkt.

	$T_{1/2}$ (h)					
	N7-ÄG		O6-ÄG		N3-ÄA	Anfangs-peak
	a	b	a	b	a	b
In vitro						
DNS	225		stabil über 240 h		33	stabil über 240 h
In vivo						
DNS, Gehirn	92	89	160	229	16	115
DNS, Leber	70	64	17	36	12	99
DNS, "Rest-Gewebe"	60		54			70
RNS, Gehirn	95	88				108
RNS, Leber	66	62				72
RNS, "Rest-Gewebe"	69					71

4. Diskussion

Es bestehen zur Zeit noch sehr unterschiedliche Vorstellungen hinsichtlich der für eine nachfolgende maligne Transformation entscheidenden Angriffspunkte von Cancerogenen in der Zelle. Dabei werden neben der DNS auch die transfer-RNS (106) und Proteine diskutiert (85, 86) oder eine Aktivierung oncogener Viren angenommen (100, 23). Im folgenden soll nur auf Wechselwirkungen von Carcinogenen mit der DNS eingegangen werden, im Rahmen der Vorstellung, daß die entscheidende Veränderung mit der Konsequenz einer malignen Transformation im Sinne einer Mutation in der DNS stattfinden könnte.

4.1. Vergleich der cancerogenen und äthylierenden Eigenschaften von Äthylnitrosoharnstoff mit denen anderer alkylierender Carcinogene

Nimmt man eine lineare Beziehung zwischen der Gewebekonzentration eines Carcinogens und dem Grad der Alkylierung der Nucleinsäuren an (was im verwendeten Dosisbereich erlaubt scheint (17, 39)), so kann man die für verschiedene alkylierende Cancerogene nach jeweils unterschiedlicher Dosierung gemessenen Äthylierungsausbeuten auf äquimolare Dosen umrechnen und so die Reaktivität der einzelnen Substanzen vergleichen. Dabei findet man am Beispiel des Hauptalkylierungsprodukts N7-Äthylguanin eine höhere Alkylierungsausbeute für methylierende gegenüber äthylierenden Agentien (97, 98), obwohl letztere in der Regel stärker carcinogen sind (28). Ein Vergleich der eigenen, für ÄNH im Gehirngewebe gemessenen Werte mit den entsprechenden Werten für MNH (50) zeigt, daß die Methylierungsausbeute gegenüber der Äthylierungsausbeute um etwa den Faktor 60 höher liegt. Ein ähnliches Verhältnis ergibt sich für die Alkylierungsausbeuten am N7 des Guanins in Leber-DNS nach Anwendung der Lebercarcinogene DMN und DÄNA. Die für DMN angegebenen Werte (97, 19, 71) liegen um etwa den Faktor 50

höher als die eigenen Werte für DÄNA.

Ein weiterer interessanter Vergleich kann zwischen ÄNH und Methylmethansulfonat (MMS) angestellt werden. Nach transplacentarer Anwendung von MMS wurden ebenfalls neurogene Tumoren beobachtet (49), wenn auch mit wesentlich geringerer Ausbeute. Während für ÄNH in einer Dosierung von 20 mg/kg bei BD IX-Ratten am 15. Tag der Gravidität die Tumorausbeute bei den Nachkommen praktisch 100 % beträgt (46), liegt sie unter den gleichen Bedingungen für MMS nur bei 20 %. Dagegen ist die Alkylierungsausbeute am N7 des Guanins im Gehirn (97) um den Faktor 54 höher als bei Anwendung von ÄNH.

Diese Befunde schienen auf den ersten Blick gegen eine Bedeutung der Alkylierung von Nucleinsäuren, insbesondere der DNS, im Prozess der malignen Transformation zu sprechen. Sie waren daher Anlaß zu differenzierteren Untersuchungen mit dem Ziel einer Klärung der folgenden Fragen:

(1) Sind die Muster der nach Anwendung verschiedener alkylierender Agentien unterschiedlichen Alkylierungsprodukte an Nucleinsäurebasen qualitativ und quantitativ vergleichbar?
Bestehen Korrelationen zwischen der relativen Häufigkeit bestimmter Alkylierungsprodukte und der Wahrscheinlichkeit einer malignen Transformation?
Sind unter Umständen nicht das Hauptreaktionsprodukt der DNS mit alkylierenden Agentien, das N7-Alkylguanin, sondern ander, in geringerem Ausmaß entstehende, Alkylierungsprodukte verantwortlich für die mutagene und carcinogene Wirkung?

(2) Spielen im Hinblick auf die mögliche Bedeutung von DNS-Reparaturprozessen nach Basenalkylierung vielleicht gewebespezifisch unterschiedliche Eliminationsraten verschiedener Alkylpurinbasen aus der DNS eine Rolle hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit der malignen Transformation und der Gewebespezifität bestimmter Cancerogene?

Neben den eigenen Ergebnissen sprechen auch Befunde anderer Autoren gegen eine entscheidende Bedeutung der Alkylierung am N7 des Guanins. So verglichen Swann u. Magee (97) die tumorigenen Eigenschaften der methylierenden Verbindungen DMN, MNH, MMS und DMS mit dem Ausmaß der N7-MG-Bildung und fanden keine Korrelation. Loveless u. Hampton zeigten, daß MNH für T2-Phagen ein potentes Mutagen darstellt(64), während MMS keine mutagene Wirkung besitzt (63). In beiden Fällen werden jedoch vergleichbare Ausbeuten an N7-MG beobachtet.

Daß eine Alkylierung am N7 des Guanins z.B. bei der nächstfolgenden DNS-Replikation zu einer falschen Basenpaarung führen könnte, ist denkbar. Für einen solchen Mechanismus wurden zwei Modelle vorgeschlagen: Lawley u. Brookes (52) gehen davon aus, daß durch Alkylierung am N7 die ionischen Eigenschaften des Guaninmoleküls so verändert werden, daß bei neutralen pH-Werten eine negative Ladung am N1 auftritt. Dagegen nimmt Nagata (8o) an, daß Alkylierung am N7 des Guanins zu einer Enolisierung am O6 führt. In beiden Fällen könnte das alkylierte Guanin bei der nächstfolgenden DNS-Replikation mit Thymin statt Cytosin paaren (siehe Abb. 17). Ludlum (68) konnte jedoch in einem in vitro-System mit N7-MG enthaltenden Polymeren zeigen, daß entgegen diesen theoretischen Voraussagen N7-MG normal mit Cytosin paart.

Wenn somit auch eine Alkylierung am N7 des Guanins nicht mit den mutagenen und cancerogenen Eigenschaften eines alkylierenden Agens in Beziehung gebracht werden kann, so kann sie doch möglicherweise für eine toxische Wirkung verantwortlich gemacht werden. Ergebnisse von Bosch et al. (16) deuten darauf hin, daß die Menge der alkylierten Basen in der DNS für die Zellschädigung einen ausschlaggebenden Faktor darstellt. Das am N7 alkylierte Guaninmolekül wird hydrolytisch aus der DNS herausgespalten((52)siehe auch 3.2.1.), was mit großer Wahrscheinlichkeit einen Bruch der Zucker-Phosphatkette an dieser Stelle

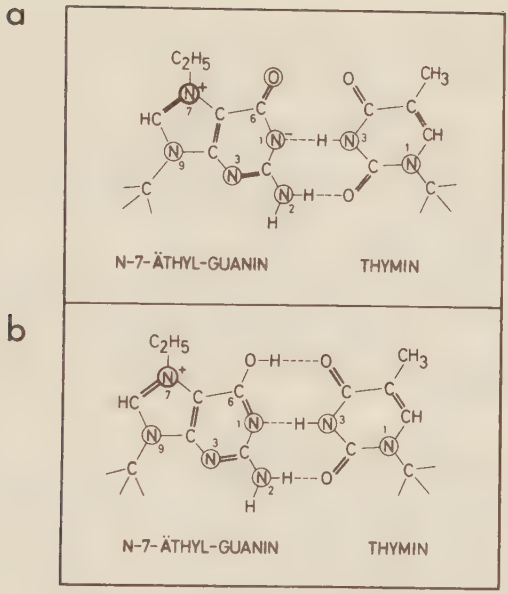


Abb. 17: Modelle für eine anomale Basenpaarung des am N7 alkylierten Guanins mit Thymin

a) nach Lawley u. Brookes (52),
b) nach Nagata (80).

zur Folge hat (10). Solche Einzelstrangbrüche können von der Zelle repariert werden (24). Wenn jedoch die DNS repliziert wird, bevor eine Reparatur eines Einzelstrangbruches erfolgt ist, so ist dies mit großer Wahrscheinlichkeit für die Zelle letal (vgl. auch Deletionsmechanismus, 1.1.). So wurden toxische Wirkungen von MNH und ÄNH auch nur in proliferierenden Geweben beobachtet, während nicht-proliferative Zellen gegenüber der letalen Schädigung resistent schienen (6). Daß der Zelltod ein aktiver Prozeß ist, der mit einer Störung der de novo-Synthese von Proteinen in Zusammenhang steht, zeigt der Befund, daß die Anwendung von Cycloheximid (Inhibitor der Proteinsynthese) nach ÄNH-Applikation einen Aufschub des Zelltodes bewirkt (7).

Wenn die toxische Wirkung eines Agens auf Einzelstrangbrüche der DNS zurückgeführt werden kann, so ließe sich damit auch die erhöhte toxische Wirkung methylierender gegenüber äthylierenden Agentien (28) erklären, da, wie oben erwähnt, methylierende Substanzen stets stärker mit der DNS reagieren, also in der Folge auch mehr Einzelstrangbrüche bewirken, und, wie unter 4.2.2. gezeigt wird, N7-MG auch schneller aus der DNS eliminiert wird als N7-ÄG.

Neben dem N7 des Guanins kommen folgende Positionen in den Nucleinsäurebasen für eine Alkylierungsreaktion bevorzugt in Frage: N3 und O6 des Guanins, N1, N3 und N7 des Adenins, N3 des Cytosins.

Tabelle 19 enthält eine Übersicht über die von einigen Autoren angegebenen relativen Anteile der einzelnen methylierten Basen nach Reaktion mit verschiedenen Methylierungsmitteln. Neben gewissen Unterschieden in der Reaktivität der Basen in RNS und DNS (52) wird vor allem die unterschiedliche Reaktionsweise der methylierenden Nitrosoverbindungen gegenüber den einfachen Methylierungsagentien DMS und MMS deutlich. Anscheinend wird nur durch Substanzen der ersten Gruppe das Guanin in meßbarer Ausbeute in der O6-Position methyliert. Die Methylierung stellt eine nucleophile Substitution dar (78, 53). DMS und MMS reagieren dabei nach dem sog. S_N2-Mechanismus (bimolekulare, nucleophile Substitution (44)) unter Ausbildung eines Überganskomplexes mit einer nucleophilen Gruppe der DNS (55). Die Nitrosoverbindungen können über das Diazoalkylkation nach dem S_N2-Mechanismus oder bei Bildung des Carboniumions nach dem sog. S_N1-Mechanismus reagieren (nucleophile Substitution, bei welcher der geschwindigkeitsbestimmende Primärschritt monomolekular verläuft (44)).Im Vergleich zu den methylierenden wird bei äthylierenden Substanzen der S_N1-Mechanismus stärker bevorzugt, da hier das Carboniumion durch den positiven Induktionseffekt der Äthylgruppe stabilisiert wird. Nach der Kornblum-Regel (vgl.(5))reagieren "S_N2-Agentien" bevorzugt mit dem Partner mit der größten nucleophilen Kraft (größte

Tabelle 19:

Relative Anteile methylierter Basen in DNS und RNS nach in vitro- oder in vivo-Reaktion mit methylierenden Carcinogenen a) vom "S_N1"-Typ (DMN, MNH, MNNG)und b) vom "S_N2"-Typ (DMS, MMS).
Die Untersuchungen wurden durchgeführt 1) in vitro mit MNNG und DMS an Lachsspermien-DNS (55), mit MNH und DMS an µ2 Bacteriophagen-RNS (58), 2) in vivo mit MNNG an DNS von E. Coli (56), mit MNNG und DMS an DNS von L-Zellen (55), mit DMN, MNH u. MMS an RNS und DNS von Rattenleber (82, 83, 21) und von Rattengehirn (50), nach MNH an DNS von verschiedenen Mäusegeweben (35). Bei den in vitro-Versuchen betrug die Inkubationszeit mit dem methylierenden Agens 2-3 h. In den in vivo-Versuchen wurde die Methylierung 2-5 h nach Applikation des methylierenden Cancerogens gemessen.

Es ist jeweils die Schwankungsbreite für die Meßwerte der verschiedenen Autoren, bzw. für die verschiedenen untersuchten Gewebe angegeben.

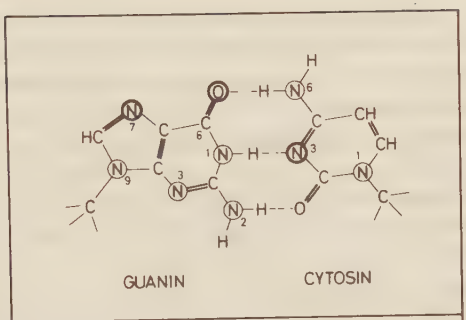
Methylierte Nucleinsäure-basen	Relative Anteile (%) methylierter Basen nach Reaktion mit			
	a) DMN, MNH, MNNG		b) DMS, MMS	
	RNS	DNS	RNS	DNS
N7-MG	76-83	65-88	54-75	71-91
N3-MA	<1	2-12	3	7-19
O6-MG	3-4	6-11	- x	- x
N3-MG	<1	<1	<1	<1
N1-MA	1-3	<1	9-14	1-3
N7-MA	1-3	<1	0,7-2	<1
N3-MC	1-3	0,6-2	8-13	0,5-2

x unter der Nachweisgrenze

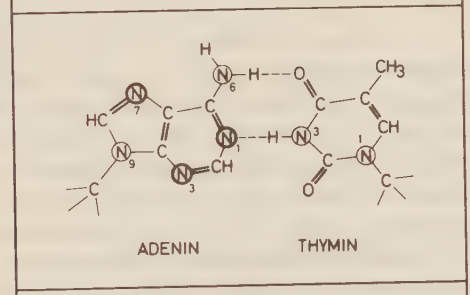
Polarisierbarkeit). Das ist bei den Nucleinsäurebasen vor allem das N7 des Guanins, dann N1 des Adenins und N3 des Cytosins, welche aber beide in DNS durch Wasserstoffbrücken abgeschirmt sind, und schließlich das N3 des Adenins (55). "S_N1-Agentien" dagegen reagieren bevorzugt mit dem Partner mit der höchsten Elektronendichte (größte Elektronegativität). In den Nucleinsäurebasen ist dies (55, 58) die O6-Position des Guanins (obwohl deren Reaktivität durch Was-

serstoffbrücken sicher vermindert ist), und außerdem möglicherweise die Phosphodiestergruppe in der Zuckerphosphatkette. Wie in 3.1.1.3. erwähnt, wurde von mehreren Autoren bei der chromatographischen Trennung von Nucleinsäurehydrolysaten ein bislang nicht identifizierter radioaktiver Peak gefunden, den man durch Alkylierung entstandenen Phosphotriestern zuordnen könnte. Dieser Peak war besonders ausgeprägt im Falle der Nitrosoverbindungen (58, 82, 83) und stets bei äthylierenden höher als bei methylierenden Agentien (ÄMS-MMS, vgl. (4), DÄNA-DMN, vgl. (70)). Während die biologischen Konsequenzen einer Alkylierung der Phosphatkette noch unklar sind (möglicherweise Kettenbruch, vgl. (84)), scheint dem in 06-Position alkylierten Guanin besondere Bedeutung zuzukommen. Durch eine Alkylierung in 06-Position wird das Guaninmolekül in seiner tautomeren Enolform fixiert. Theoretisch sollte diese Reaktion eine falsche Basenpaarung begünstigen((65), siehe Abb. 18). In einem in vitro-System konnten Gerchmann u. Ludlum (36) dies vor kurzem auch experimentell zeigen. Ein Vergleich zwischen der Carcinogenität verschiedener Substanzen und den entsprechenden molaren 06-Alkylguanin-Anteilen in der DNS ergibt nach den bisher vorliegenden Befunden (im Gegensatz zum N7-Alkylguanin) eine gute Korrelation. So konnte im Falle der relativ schwachen Cancerogene DMS und MMS kein 06-MG nachgewiesen werden (55, 58, 50, 21). Loveless (65) erklärte mit dem Fehlen einer 06-Guanin-Alkylierung auch das Ausbleiben einer mutagenen Wirkung von MMS im Gegensatz zu MNH bei T_2-Phagen. Möglicherweise läßt sich die höhere Mutagenität (63) und Carcinogenität (28) äthylierender gegenüber methylierenden Verbindungen auch durch stärkere Reaktion am 06 des Guanins deuten. In diesem Sinne könnte der in der vorliegenden Untersuchung erhobene Befund, wonach 06-ÄG fast 30 % der nach einem ÄNH-Puls in der DNS identifizierten Äthylbasen ausmacht, möglicherweise zur Erklärung der hohen Wirksamkeit dieses Cancerogens herangezogen werden.

a



b



c

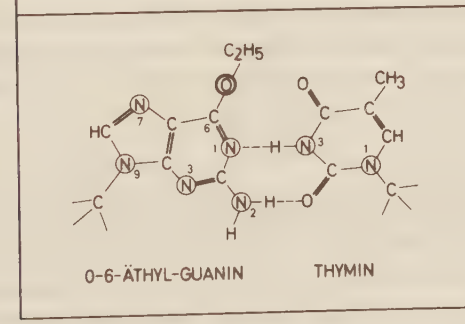


Abb. 18: Basenpaarung von Guanin mit Cytosin (a) und Adenin mit Thymin (b) nach dem Watson-Crick Modell und Modell einer falschen Basenpaarung des am 06-äthylierten Guanins (c).

Neben einer Reaktion am O6 könnte nach Lawley, Orr u. Shah (57) auch eine Alkylierung am N3 des DNS-Guanins ein "mispairing" bewirken. Da N3-MG in geringer Ausbeute auch von "S_N2-Agentien" gebildet wird (vgl. Tabelle 19), könnte es deren schwache carcinogene Wirkung erklären.

Der molare Anteil der durch ÄNH in der O6-Position äthylierten DNS-Guaninmoleküle betrug 0,9-1,7 x 10^{-5}. Nimmt man den DNS-Gehalt einer diploiden Zelle mit 6 x 10^{-9} mg an (13), so bedeutet dies, daß etwa 3 x 10^4 Moleküle O6-ÄG in der DNS einer solchen Zelle gebildet werden. Ein außerordentlich wichtiger, in der Zukunft noch zu klärender Punkt betrifft die Verteilung der O6-ÄG-Moleküle am DNS-Strang. Es ist noch nicht bekannt, ob eine rein zufällige Verteilung oder eine Häufung alkylierter Guaninmoleküle in bestimmten Regionen der DNS vorliegt, die unter Umständen einer Reaktion mit Alkyl-Kationen eher zugänglich sein könnten. Hier wäre an mögliche Unterschiede in Abhängigkeit von der Besetzung der DNS mit Histon- und Nicht-Histon-Proteinen (z.B. Eu- und Heterochromatin) zu denken. Die Bedeutung einer Alkylierung sowohl von DNS-Basen als auch von Kernproteinen für die Störung von DNS-Protein-Interaktionen im Zusammenhang mit der Genexpression läßt sich zur Zeit noch nicht übersehen.

4.2. Mögliche Determinanten für die Organspezifität der carcinogenen Wirkung von Äthylnitrosoharnstoff

Obwohl ÄNH nicht wie z.B. DÄNA einer organtypischen enzymatischen Aktivierung bedarf, weist die Substanz eine ausgeprägte Organspezifität der cancerogenen Wirkung auf. Dies scheint bei einer so instabilen und hoch reaktiven Substanz schwer vorstellbar, da man eine unspezifische Reaktion mit den verschiedensten Molekülen in den Zellen aller Gewebe vermuten muß. In der Tat wurde unter 3.1.2. gezeigt, daß die Organspezifität der cancerogenen Wirkung des ÄNH nicht etwa auf eine unterschiedliche alkylierende Aktivität in den verschiedenen Geweben der Ratte zurückge-

führt werden kann. Die initialen Äthylierungsausbeuten in den Nucleinsäuren liegen in "Carcinogen-gefährdeten" und "ungefährdeten" Geweben in der gleichen Größenordnung. Die Spezifität scheint deshalb möglicherweise weniger durch die chemischen Eigenschaften des Cancerogens bzw. durch seine spezifische Reaktion in den Zellen eines bestimmten Gewebes, als vielmehr durch unterschiedliche Eigenschaften der Zellen verschiedener Gewebe selbst bedingt zu sein.

4.2.1. Proliferative Aktivität (DNS-Replikations- und Zellteilungsrate) des Gewebes

Es gibt Hinweise darauf, daß die proliferativen Eigenschaften einer Zellpopulation eine wichtige Rolle im Prozeß der malignen Transformation spielen (87, 89). So scheinen in Zellsystemen, deren Zellen nicht mehr die Fähigkeit zur Proliferation besitzen, keine Tumoren aufzutreten (adulte Nervenzellen, Muskelzellen). Umgekehrt beobachtet man eine erhöhte Tumorigenität onkogener Agentien in embryonalen oder neonatalen Geweben mit hoher Zellproliferationsrate gegenüber den entsprechenden adulten Geweben (28).

Eine hohe DNS-Replikations- und Zellteilungsrate erhöht die Häufigkeit der Fixierung der vom Carcinogen induzierten Veränderung und beschleunigt die phänotypische Expression maligner Eigenschaften (3, 99, 91). So zeigen verschiedene Cancerogene bei zusätzlicher Stimulation der DNS-Synthese eine erhöhte Tumorigenität (103, 74, 40, 20, 22). Auch gegenüber ÄNH ändert sich die Empfindlichkeit einzelner Gewebe mit ihrem Funktionszustand. So haben Untersuchungen von Alexandrov (1) gezeigt, daß hohe ÄNH-Dosen bei graviden Rattenweibchen Uterus- und Vaginalcarcinome hervorrufen können, während bei nicht-graviden Tieren solche Tumoren nicht beobachtet werden. Weitere Befunde in dieser Richtung sind, daß das Gehirn der foetalen Ratte vor dem 12. Tag der praenatalen Entwicklung gegen die carcinogene Wirkung von ÄNH unempfindlich zu sein

scheint, während die Empfindlichkeit in der perinatalen Phase (hohe Proliferationsaktivität der Gliazellpopulationen) gegenüber dem adulten Gehirn auf das 50-100fache ansteigt (46). Auch das Verteilungsmuster der Tumoren ändert sich in Abhängigkeit vom Stadium der Foetalentwicklung zum Zeitpunkt des ÄNH-Pulses. So wurden Tumoren im Bereich des N. Trigeminus nur nach ÄNH-Applikation während eines kurzen Zeitraums vor und nach der Geburt beobachtet, wobei es interessant ist, dass der N.Trigeminus entscheidend am Saugreflex der neugeborenen Ratte beteiligt ist (31).

Da es in der Literatur Hinweise darauf gibt, daß die Alkylierung der DNS mit abhängt von ihrem physikalischen Zustand und dem Vorliegen von Wasserstoffbrückenbindungen (52, 67), wäre es denkbar, daß die Wahrscheinlichkeit einer Basenalkylierung während der Replikation der DNS erhöht ist. Im Rahmen der Genauigkeit der Methode konnten wir jedoch bei um den Faktor 18 gesteigerter DNS-Syntheserate(3.1.2.3.1) oder bei fast vollständiger Hemmung der DNS-Synthese (3.1.2.3.2.) keine Unterschiede im Äthylierungsgrad der DNS-Purinbasen feststellen. So bleibt als mögliche Erklärung für die Abhängigkeit der Cancerogen-Empfindlichkeit eines Gewebes von seiner proliferativen Aktivität, daß der vom Carcinogen bewirkte Schaden genetisch "fixiert"werden muß und eine solche "Fixation" offenbar eine Replikation der DNS voraussetzt. Die Wahrscheinlichkeit einer Fixierung wäre dann eine Funktion der proliferativen Aktivität (d.h. des Anteils an proliferierenden Zellen und der Zellcyclusdauer im Verhältnis zur Dauer der S-Phase) in dem betroffenen Gewebe.

In der foetalen und neugeborenen Ratte weisen alle Gewebe eine hohe proliferative Aktivität auf. Auch im Gehirn ist eine hohe Proliferationsrate, vor allem der Gliazellpopulationen, bis ungefähr drei Wochen nach der Geburt nachweisbar (2). Die im Vergleich zum adulten Tier erhöhte Empfindlichkeit des Nervensystems gegenüber ÄNH im perinatalen Alter ließe sich also möglicherweise durch Proliferationsunterschiede deuten. Dagegen kann durch Prolifera-

tionsunterschiede nicht erklärt werden, warum ausschließlich mit dem Nervensystem verbundene Tumoren entstehen und nicht auch Tumoren anderer Gewebe, die in diesem Stadium gleich stark oder stärker proliferieren. Diese Gewebespezifität der cancerogenen Wirkung könnte jedoch mit einer unterschiedlichen Fähigkeit der Gewebe in Zusammenhang gebracht werden, cancerogen-induzierte Schäden, z.B. an der DNS, zu "reparieren".

4.2.2. Eliminationsgeschwindigkeit äthylierter Basen aus der DNS

Für eine zeitabhängige Abnahme des Gehalts alkylierter Basen in den Nucleinsäuren sind grundsätzlich mehrere Mechanismen verantwortlich zu machen.

a) hydrolytische Abspaltung der alkylierten Basen aus den Nucleinsäuren, da eine Alkylierung an einem Ringstickstoff der Basen eine Labilisierung der N-glykosidischen Bindung zur Folge hat (siehe 3.2.1.).

b) Elimination letal geschädigter Zellen aus der Zellpopulation. Für den Alkylierungsgrad der einzelnen Zellen einer Population kann man eine statistische Verteilung annehmen. Die am stärksten alkylierten Zellen gehen möglicherweise zugrunde. Dadurch würde die gemessene mittlere Alkylierungsausbeute der Restpopulation ebenfalls vermindert.

c) Reduktion ("Verdünnung") des mittleren Gehalts der DNS an alkylierten Basen durch DNS-Replikation, d.h. Zellproliferation.

d) Enzymatische "Excision" alkylierter Basen aus der DNS. Während eine Reparatur-Replikation der DNS (96) in Säugerzellen nach Behandlung mit alkylierenden Agentien bereits eindeutig nachgewiesen wurde (90, 60, 16), ist für die im Rahmen von Reparaturprozessen der DNS not-

wendige Excision alkylierter Basen noch nicht geklärt, ob sie nach einem ähnlichen Mechanismus verlaufen kann wie nach UV-Bestrahlung von Zellen, wo eine enzymatische Erkennung und Excision von Pyrimidin-Dimeren aus der DNS erfolgt (siehe z.B.(15)).

Die Rate der hydrolytischen Äthylpurinbasen-Abspaltung aus der DNS wurde durch in vitro-Inkubation bei pH 7,2 und 37°C bestimmt. Während N3-ÄA sehr schnell eliminiert wird ($T_{1/2}$ = 33 h), beträgt die Halbwertszeit von N7-ÄG fast 10 Tage. Dagegen scheint O6-ÄG in der DNS völlig stabil zu bleiben. Dieselbe Reihenfolge in bezug auf die Stabilität der Alkylpurinbasen in der DNS in vitro ergibt sich für die Methylhomologen (siehe Tabelle 20). Allerdings werden methylierte Basen aus der DNS allgemein schneller eliminiert als äthylierte Basen (52). Dies konnte durch den positiven Induktionseffekt der Äthylgruppe erklärt werden, der das quartäre Ammoniumion stabilisiert. Eine raschere Eliminierung methylierter Purinbasen aus der DNS erfolgt auch unter in vivo-Bedingungen. In Abb. 19 wurde die von Craddock und Magee (17) gemessene Eliminationsrate von N7-MG aus adulter Rattenleber-DNS nach Applikation von DMN derjenigen von N7-ÄG gegenübergestellt, die von uns nach Applikation von DÄNA bestimmt wurde. Zum Vergleich wurde auf äquimolare Dosen umgerechnet. Man erkennt, daß sehr viel mehr N7-MG gebildet, dieses aber auch schneller eliminiert wird. Allerdings muß bei diesem Vergleich berücksichtigt werden, daß im Falle des N7-MG nur bis zu 48 h nach DMN-Applikation gemessen und eine Dosis höherer Toxizität (30 mg/kg) verwendet wurde. Auch hier hätte man möglicherweise nach einem anfänglich durch toxische Effekte bedingten steilen Abfall (siehe (b)) eine langsamere Eliminationsrate des N7-MG gefunden. So gibt Margison (71) als Halbwertszeit für den N7-MG-Gehalt der adulten Rattenleber-DNS nach in vivo Applikation von 2 mg ^{14}C-DMN/kg Kgw. einen Wert von 72 h an, was noch immer sehr viel schneller ist als der für N7-ÄG gefundene Wert von 110 h.

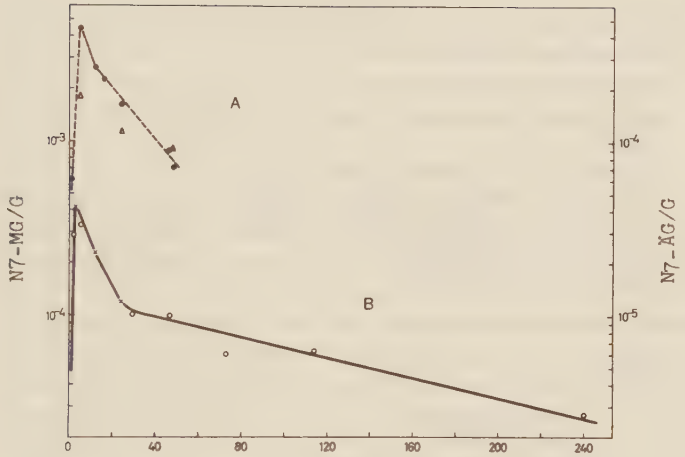


Abb. 19: Vergleich der Eliminierung von N7-MG und N7-ÄG aus adulter Rattenleber-DNS

A) Abnahme des N7-MG-Gehalts in der Leber-DNS weiblicher Wistar-Albino-Ratten nach einmaliger Applikation von DMN -●-●- 30 mg/kg Kgw. (14)
2 mg/kg Kgw. (19).
In beiden Fällen wurden die Werte unter Annahme einer linearen Beziehung zwischen Dosis und Alkylierungsausbeute zum besseren Vergleich auf die gleiche molare Dosis wie in B) umgerechnet.

B) Abnahme des N7-ÄG-Gehaltes in der Leber-DNS männlicher BD IX-Ratten nach einmaliger Applikation von 10 mg DÄNA/kg Kgw.-o-o- Für die mit x bezeichneten Punkte wurden von J. Oberbarnscheidt (81) ermittelte Werte mit verwendet.

Wie stark die unter (c) angeführte Verdünnung der alkylierten DNS durch Zellproliferation die Halbwertszeit des Alkylbasengehalts der DNS beeinflußt, kann man etwa abschätzen, wenn man die entsprechenden $T_{1/2}$-Werte für N7-ÄG/G in adulter Leber-DNS (nach DÄNA: $T_{1/2}$ = 110 h) und in der Leber von 10 Tage alten Ratten (nach ÄNH: $T_{1/2}$=75 h) miteinander vergleicht. - Während Margison (71) die Halb-

Tabelle 20:

Halbwertszeiten für den Gehalt methylierter und äthylierter Purinbasen der DNS

a) bei in vitro-Inkubation bei 37°C und pH 7,2

b) nach einer einmaligen Dosis von DMN, DÄNA, ÄNH in vivo

	$T_{1/2}$					
	N7-MG	O6-MG	N3-MA	N7-ÄG	O6-ÄG	N3-ÄA
a) in vitro	144(1)[x]	sta-(2)[x] bil (5)[x]	24(3)[x]	225	stabil	33
b) in vivo						
Leber, adult, nach DMN	72(1)[x]	13(2)[x]	3(3)[x]			
Leber, adult, nach DÄNA				110		
Leber, adult Gabe von DMN nach Teilhepatektomie	24(4)[x]	24(4)[x]	7(4)[x]			
Leber 10 Tage alter Tiere nach ÄNH				70	17	12
Gehirn 10 Tage alter Tiere nach ÄNH				92	160	16

[x] Referenzen:
1 Margison et al. (71)
2 O'Connor et al. (83)
3 Margison, O'Connor (72)
4 Craddock (1973) (21)
5 Lawley, Thatcher (1971) (55)

wertszeit für den N7-MG-Gehalt adulter Rattenleber-DNS mit 72 h bestimmte, fand Craddock (21) nach 2/3-Hepatektomie einen Wert von 24 h. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich durch den "Verdünnungseffekt" infolge der erhöhten Rate der Zellproliferation nach Teilhepatektomie zu erklären.

Die nach einem ÄNH-Puls bei 10 Tage alten Ratten gemessene Eliminierung der Basen N3-ÄA und N7-ÄG aus der DNS von Gehirn und Leber verläuft in beiden Geweben mit jeweils ähnlicher Geschwindigkeit; in Gehirn jeweils etwas langsamer als in Leber - wahrscheinlich da in der Leber die proliferative Aktivität zu diesem Zeitpunkt bereits höher ist als im Gehirn. Die Abnahme des N3-ÄA- und N7-ÄG-Gehalts in der DNS dieser Gewebe läßt sich durch die unter (a) - (c) beschriebenen Mechanismen hinreichend erklären.

Dagegen scheint im Falle des O6-ÄG eine enzymatische Excision aus der DNS wahrscheinlich, und zwar auf Grund des großen Unterschiedes der Eliminationsraten dieses Äthylierungsproduktes aus Leber- und Gehirn-DNS. Daß die wesentlich langsamere Abnahme des O6-ÄG-Gehalts der Gehirn-DNS nicht einfach durch eine geringere Proliferationsrate in diesem Gewebe bedingt ist, ergibt sich aus den in Leber und Gehirn jeweils ähnlichen Werten für N3-ÄA und N7-ÄG.

Der gewebespezifische carcinogene Effekt des ÄNH hängt demnach möglicherweise mit der sehr langsamen Eliminierung von O6-ÄG aus der DNS der Zellen des Nervensystems zusammen. Dadurch könnte in diesen Zellen die Wahrscheinlichkeit der "Fixierung" einer genetischen Veränderung der DNS bei der folgenden DNS-Replikation erhöht sein.

Die in diesen Versuchen festgestellte verminderte Fähigkeit von Gehirngewebe, O6-ÄG zu eliminieren, kann vielleicht mit Befunden von Liebermann und Forbes (61) in Zusammenhang gebracht werden, die nach UV-Bestrahlung oder Behandlung mit chemischen Carcinogenen (N-Acetoxy-2-Acetylaminofluoren, 7-Brommethylbenzanthracen) in Neuronen des Cere-

bellums und gestreiften Myocyten im Gegensatz zu anderen untersuchten Geweben keine Reparatur-Replikation fanden. Andere Autoren (92) konnten allerdings in Neuronen von Hühner- oder Mäuseembryonen nach UV-Bestrahlung oder MMS-Behandlung eine "Repair-DNS-Synthese" nachweisen. Möglicherweise geht die in embryonalen Nervenzellen noch vorhandene Fähigkeit, strukturelle Veränderungen in der DNS zu erkennen und zu eliminieren, im Verlauf der weiteren Differenzierung dieser Zellen verloren.

Eine enzymatische O-Demethylierung der Base O6-MG konnten Miller, Lawley u. Shah in Bakterien und embryonalen Hamsterzellen nachweisen (77). In den Nucleinsäuren selbst ist nach Ansicht dieser Autoren eine O-Demethylierung allerdings weniger wahrscheinlich als eine enzymatische Excision des O6-alkylierten Nucleotids. Hinsichtlich der Möglichkeit einer enzymatischen Deäthylierung von Purinbasen liegen bisher experimentelle Befunde nicht vor.

Veleminsky et al. (102) haben gezeigt, daß bei Gerstensamen die "Erholung" von MNH-induzierten genetischen Schäden verbunden ist mit einer enzymatischen Reparatur von Einzelstrangbrüchen und Apurinstellen der DNS, während die Excision von N7-MG nicht zu diesem enzymatischen Reparaturmechanismus zu gehören scheint.

Eine enzymatische Excision von N7-MG nach MNNG-Behandlung scheint auch in E.coli nicht zu erfolgen. Dagegen gilt dies im Falle des N3-MA und des O6-MG als möglich(56), denn die Zellen eines gegen MNNG sehr viel empfindlicheren E.coli-Stammes (B_{S-1}) konnten die beiden methylierten Basen nur sehr viel langsamer aus ihrer DNS eliminieren als diejenigen des resistenten Stammes (B/r).

Eine möglicherweise kausale Beziehung zwischen Carcinogenese und der Fähigkeit der Zelle, Schäden an der DNS zu reparieren, scheint im Falle der menschlichen Hautkrankheit Xeroderma pigmentosum zu bestehen. Hier sind die Hautzellen

der für Hautkrebs extrem anfälligen Kranken durch ein defektes Reparatursystem für UV-induzierte Veränderungen der DNS charakterisiert (14, 95).

Auf Grund der diskutierten Befunde verdient die Möglichkeit, daß die Spezifität des cancerogenen Effekts von ÄNH für das zentrale und periphere Nervensystem mit einer unzureichenden Fähigkeit der entsprechenden Zellen zur Elimination von O6-ÄG aus ihrer DNS in Zusammenhang steht, besondere Aufmerksamkeit.

5. Zusammenfassung

Eine einzige Dosis des Nitrosamids N-Äthyl-N-nitroso-harnstoff (ÄNH) erzeugt bei Ratten im perinatalen Alter spezifisch maligne Tumoren im zentralen und peripheren Nervensystem. Infolge seiner raschen Heterolyse unter physiologischen Bedingungen ($T_{1/2} \sim 8$ min) kann ÄNH als Puls-Cancerogen bezeichnet werden. Als Folge einer Wechselwirkung von Nucleinsäuren mit der in vivo gebildeten Wirkform des Carcinogens, dem Äthylcarboniumion, wird eine Äthylierung der Purinbasen beobachtet.

Der initiale Grad der Äthylierung 1 h nach Applikation von ^{14}C-ÄNH wurde in den Nucleinsäuren verschiedener Gewebe der foetalen, neugeborenen und adulten BD IX-Ratte bestimmt. Die relativen Anteile der untersuchten Äthylierungsprodukte der DNS waren in allen Geweben ähnlich: N7-Äthylguanin (N7-ÄG $\sim$ 54 % der gebildeten Äthylpurinbasen), O6-Äthylguanin (O6-ÄG $\sim$ 28 %), N3-Äthyladenin (N3-ÄA $\sim$ 17 %) und N7-Äthyladenin (N7-ÄA $\sim$ 2 %) und entsprachen den bei in vitro-Äthylierung der DNS durch ÄNH gefundenen Werten. Auch die molaren Anteile der äthylierten Basen in "cancerogen-gefährdetem" Gewebe (Gehirn) und "unempfindlichem" Gewebe (Leber) waren ähnlich groß (äthylierte Purinbase/Gesamtmenge der Purinbase $\sim 10^{-5}$) und offenbar unabhängig von der DNS-Replikationsrate in den untersuchten Geweben. Der initiale Grad der Äthylierung der Nucleinsäuren in verschiedenen Geweben erklärt somit nicht die Spezifität der cancerogenen Wirkung von ÄNH für das Nervengewebe.

Es wurde daher die Frage einer möglichen unterschiedlichen Persistenz äthylierter Basen in der DNS der untersuchten Gewebe geprüft. Bei 10 Tage alten Ratten wurde die Abnahme des Gehalts äthylierter Basen in der DNS als Funktion der Zeit gemessen. Dabei waren die jeweiligen Eliminationsraten von N7-ÄG und N3-ÄA aus Leber- und Gehirn-DNS sehr ähnlich. Einzig O6-ÄG wurde aus Gehirn-DNS sehr viel langsamer eliminiert ($T_{1/2} \sim 229$ h) als aus Leber-DNS ($T_{1/2} \sim 36$h).

Eine Alkylierung am O6 des Guanins könnte u.a. bei der nachfolgenden DNS-Replikation zu einer anomalen Basenpaarung führen. Die verminderte Fähigkeit von Gehirnzellen, O6-ÄG aus ihrer DNS zu eliminieren, verbunden mit ihrer gerade im perinatalen Alter hohen Proliferations-(DNS-Replikations-)rate könnte daher zur Erklärung der Nervensystem-spezifischen cancerogenen Wirkung von ÄNH herangezogen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. ALEXANDROV, V.A.: Uterine, vaginal and mammary tumours induced by nitrosoureas in pregnant rats. Nature 222, 1064-1065 (1969).

2. ALTMAN, J.: DNA metabolism and cell proliferation. In: Handbook of Neurochemistry, Vol.III, p.137-182. New York-London: Plenum Press (1969).

3. BADER, J.P.: Transformation by Rous sarcoma virus: a requirement for DNA synthesis. Science 149, 757-758 (1965).

4. BANNON, P., VERLY, W.: Alkylation of phosphates and stability of phosphate triesters in DNA. Eur. J. Biochem. 31, 103-111 (1972).

5. BEYER, H.: Lehrbuch der organischen Chemie. p. 121. Leipzig: S. Hirzel (1967).

6. BOSCH, D.A., GERRITS, P.O., EBELS, E.J.: The cytotoxic effect of ethylnitrosourea and methylnitrosourea on the nervous system of the rat at different stages of development. Z. Krebsforsch. 77, 308-318 (1972).

7. BOSCH, D.A., IPEMA, A., EBELS, E.J.: Different cytotoxic effects of methyl- and ethylnitrosourea on developing rat tissues and the influence of cycloheximide on cell death. Z. Krebsforsch. 79, 255-266 (1973).

8. BOVERI, T.H.: Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Jena: Fischer (1914).

9. BROOKES, P., LAWLEY, P.D.: The alkylation of guanosine and guanylic acid. J. Chem. Soc. 3923-3928 (1961).

10. BROOKES, P., LAWLEY, P.D.: Effects of alkylating agents on T2 and T4 bacteriophages. Biochem. J. 89, 138-144 (1963).

11. BROOKES, P., LAWLEY, P.D.: Reaction of some mutagenic and carcinogenic compounds with nucleic acids. J. Cell. and Comp. Physiol. 64, Suppl. 1, 111-128 (1964).

12. BUCHER, N.L.R.: Regeneration of mammalian liver. Int. Rev. Cytol. 15, 245-300 (1963).

13. CHARGAFF, E., DAVIDSON, J.N.: The Nucleic Acids, Vol. 1. New York-London: Academic Press (1955).

14. CLEAVER, J.E.: Defective repair replication of DNA in Xeroderma pigmentosum.
Nature 218, 652-656 (1968).

15. CLEAVER, J.E., THOMAS, G.H., TROSKO, J.E., LETT, J.T.: Excision repair (dimer excision, strand breakage and repair replication) in primary cultures of eukaryotic (bovine) cells.
Exp. Cell. Res. 74, 67-80 (1972).

16. CLEAVER, J.E.: DNA repair with purines and pyrimidines in radiation- and carcinogen-damaged normal and Xeroderma pigmentosum human cells.
Cancer Res. 33, 362-369 (1973).

17. CRADDOCK, V.M., MAGEE, P.N.: Reaction of the carcinogen dimethylnitrosamine with nucleic acids in vivo.
Biochem. J. 89, 32-37 (1963).

18. CRADDOCK, V.M., VILLA-TREVINO, S., MAGEE, P.N.: Occurence of 7-methylguanine in nucleic acids of rat liver.
Biochem. J. 107, 179-184 (1968).

19. CRADDOCK, V.M.: Stability of deoxyribonucleic acid methylated in the intact animal by administration of dimethylnitrosamine.
Biochem. J. 111, 497-502 (1969).

20. CRADDOCK, V.M.: Liver carcinomas induced in rats by single administration of dimethylnitrosamine after partial hepatectomy.
J. Nat. Cancer Inst. 47, 889-907 (1971).

21. CRADDOCK, V.M.: The pattern of methylated purines formed in DNA of intact and regenerating liver of rats treated with the carcinogen dimethylnitrosamine.
Biochem. Biophys. Acta 312, 202-210 (1973).

22. CRADDOCK, V.M.: Induction of liver tumours in rats by a single treatment with nitroso compounds given after partial hepatectomy.
Nature 245, 386-388 (1973).

23. CULLITON, B.J.: Cancer virus theories: Focus of research debate.
Science 177, 44-47 (1972).

24. DAMJANOV, I., COX, R., SARMA, D.S.R., FARBER, E.: Patterns of damage and repair of liver DNA induced by carcinogenic methylating agents in vivo.
Cancer Res. 33, 2122-2128 (1973).

25. DAS, G.D., PFAFFENROTH, M.J.: Effects of ethyl-nitrosourea on the development of the brain. Experientia 28, 1076-1077 (1972).

26. DISCHE, Z., SCHWARZ, K.: Mikromethode zur Bestimmung verschiedener Pentosen nebeneinander bei Gegenwart von Hexosen. Mikrochim. Acta 2, 13-19 (1937).

27. DRUCKREY, H., IVANKOVIC, S., PREUSSMANN, R.: Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after single injection of ethylnitrosoura to pregnant rats. Nature 210, 1378-1379 (1966).

28. DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., IVANKOVIC, S., SCHMÄHL, D.: Organotrope carcinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. Z. Krebsforsch. 69, 103-201 (1967).

29. DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., IVANKOVIC, S.: N-nitroso compounds in organotropic and transplacental carcinogenesis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 163, 676-696 (1970).

30. DRUCKREY, H., LANDSCHÜTZ, Ch., IVANKOVIC, S.: Transplacentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems. II. Äthyl-nitrosoharnstoff an 10 genetisch definierten Rattenstämmen. Z. Krebsforsch. 73, 371-386 (1970).

31. DRUCKREY, H., SCHAGEN, B., IVANKOVIC, S.: Erzeugung neurogener Malignome durch einmalige Gabe von Äthyl-nitrosoharnstoff (ÄNH) an neugeborenen und jungen BD IX-Ratten. Z. Krebsforsch. 74, 141-161 (1970).

32. DRUCKREY, H.: Genotypes and phenotypes of ten inbred strains of BD-rats. Arzneimittel-Forsch. 21, 1274-1278 (1971).

33. DRUCKREY, H., IVANKOVIC, S., GIMMY, J.: Cancerogene Wirkung von Methyl- und Äthylnitrosoharnstoff (MNH und ÄNH) nach einmaliger intracerebraler bzw. intracarotidaler Injektion bei neugeborenen und jungen BD-Ratten. Z. Krebsforsch. 79, 282-297 (1973).

34. ELING, W.: The circadian rhythm of nucleic acids. In: H. von Mayersbach, (Ed.): The Cellular Aspects of Biorhythms, p. 105. Berlin-Heidelberg-New York: Springer (1967).

35. FREI, J.V.: Tissue-dependent differences in DNA methylation products of mice treated with methyl-labelled methylnitrosourea.
Int. J. Cancer 7, 436-442 (1971).

36. GERCHMANN, L.L., LUDLUM, D.B.: The properties of O6-methylguanine in templates for RNA polymerase.
Biochim. Biophys. Acta 308, 310-316 (1973).

37. GICHNER, T., VELEMINSKY, J.: The mutagenic activity of 1-alkyl-1-nitrosoureas and 1-alkyl-3-nitro-1-nitrosoguanidines.
Mutat. Res. 4, 207-212 (1967).

38. GILES, K.W., MYERS, A.: An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid.
Nature 206, 93 (1965).

39. GOTH, R., RAJEWSKY, M.F.: Ethylation of nucleic acids by ethylnitrosourea-1-^{14}C in the fetal and adult rat.
Cancer Res. 32, 1501-1505 (1972).

40. HENNING, H., BOUTWELL, R.K.: Studies on the mechanism of skin tumor promotion.
Cancer Res. 30, 312-320 (1970).

41. HIEGER, I.: Carcinogenesis. London-New York: Academic-Press (1961).

42. HIGGINS, G.M., ANDERSON, R.M.: Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.
Arch. Pathol. 12, 186-202 (1931).

43. HUBBARD, R.W., MATTHEW, W.I., DUBOWIK, D.A.: Factors influencing the determination of DNA with indole.
Analyt. Biochem. 38, 190-201 (1970).

44. INGOLD, C.K.: Structure and Mechanism in Organic Chemistry, Kapitel 7, Ithaca-New York: Cornell University Press (1953).

45. IRVING, Ch.C.: Interaction of chemical carcinogens with DNA. In: Harris Busch, (Ed.): Methods in Cancer Research VII, p.189-244. New York-London: Academic Press (1973).

46. IVANKOVIC, S., DRUCKREY, H.: Transplacentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems. I. Äthyl-nitroso-harnstoff (ÄNH) an BD IX-Ratten.
Z. Krebsforsch. 71, 320-360 (1968).

47. KIRBY, K.S.: Deoxyribonucleic acids and cancer. In: Harris Busch, (Ed.): Methods in Cancer Research, Vol. III, siehe p.4-7. New York-London: Academic Press (1967).

48. KLEIHUES, P., PATZSCHKE, K.: Verteilung von N(^{14}C)-Methyl-N-nitrosoharnstoff in der Ratte nach systematischer Applikation.
Z. Krebsforsch. 75, 193-200 (1971).

49. KLEIHUES, P., MENDE, Chr., RENCHER, W.: Tumours of the peripheral and central nervous system induced in BD-rats by prenatal application of methyl methanesulfonate.
Europ. J. Cancer 8, 641-645 (1972).

50. KLEIHUES, P., MAGEE, P.N.: Alkylation of rat brain nucleic acids by N-methyl-N-nitrosourea and methyl methanesulfonate.
J. Neurochem. 20, 595-606 (1973).

51. KRÜGER, F.W., BALLWEG, H., MAIER-BORST, W.: Untersuchungen über die alkylierende Wirkung von ^{14}C-Methylnitrosoharnstoff und ^{14}C-Äthylnitrosoharnstoff.
Experientia 24, 592-593 (1968).

52. LAWLEY, P.D., BROOKES, P.: Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides.
Biochem. J. 89, 127-138 (1963).

53. LAWLEY, P.D.: Methylation of DNA by N-methyl-N-nitrosourethane and N-methyl-N-nitroso-N'-nitroguanidine.
Nature 218, 580-581 (1968).

54. LAWLEY, P.D., BROOKES, P., MAGEE, P.N., CRADDOCK, V.M., SWANN, P.F.: Methylated bases in liver nucleic acids from rats treated with dimethylnitrosamine.
Biochim. Biophys. Acta 157, 646-648 (1968).

55. LAWLEY, P.D., THATCHER, C.J.: Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.
Biochem. J. 116, 693-707 (1970).

56. LAWLEY, P.D., ORR, D.J.: Specific excision of methylation products from DNA of Escherichia coli treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.
Chem.-Biol. Interact. 2, 154-157 (1970).

57. LAWLEY, P.D., ORR, D.J., SHAH, S.A.: Reaction of alkylating mutagens and carcinogens with nucleic acids: N-3 of guanine as a site of alkylation by N-methyl-N-nitrosourea and dimethyl sulfate.
Chem. Biol. Interact. 4, 431-434 (1971/72).

58. LAWLEY, P.D., SHAH, S.A.: Methylation of ribonucleic acid by the carcinogens dimethyl sulfate, N-methyl-N-nitrosourea and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.
Biochem. J. 128, 117-132 (1972).

59. LAWLEY, P.D., ORR, D.J., SHAH, S.A., FARMER, P.B., JARMAN, M.: Reaction products from N-methyl-N-nitrosourea and deoxyribonucleic acid containing thymidine residues.
Biochem. J. 135, 193-201 (1973).

60. LIEBERMAN, M.W., BANEY, R.N., LEE, R.E., SELL, St., FARBER, E.: Studies on DNA repair in human lymphocytes treated with proximate carcinogens and alkylating agents.
Cancer Res. 31, 1297-1306 (1971).

61. LIEBERMAN, M.W., FORBES, P.: Demonstration of DNA repair in normal and neoplastic tissues after treatment with proximate chemical carcinogens and ultraviolet radiation.
Nature New Biol. 241, 199-201 (1973).

62. LIJINSKY, W., LOO, J., ROSS, A.E.: Mechanism of alkylation of nucleic acids by nitrosodimethylamine.
Nature 218, 1174-1175 (1968).

63. LOVELESS, A.: The influence of radiomimetic substances on deoxyribonucleic acid synthesis and function studied in Escherichia coli-phage systems. III. Mutation of T2 bacteriophage as a consequence of alkylation in vitro: the uniqueness of ethylation.
Proc. Roy. Soc. B. 15o, 497-507 (1959).

64. LOVELESS, A., HAMPTON, Ch.: Inactivation and mutation of coli-phage T2 by N-methyl- and N-ethyl-N-nitrosourea.
Mutat. Res. 7, 1-12 (1969).

65. LOVELESS, A.: Possible relevance of O6-alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides.
Nature 223, 206-207 (1969).

66. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. biol. Chem. 193, 265-275 (1951).

67. LUDLUM, D.B.: Alkylation of polynucleotide complexes.
Biochim. Biophys. Acta 95, 674-676 (1965).

68. LUDLUM, D.B.: The properties of 7-methylguanine-containing templates for ribonucleic acid polymerase.
J. Biol. Chem. 245, 477-482 (1970).

69. MAGEE, P.N., FARBER, E.: Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat-liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo.
Biochem. J. 83, 114-124 (1962).

70. MAGEE, P.N., LEE, K.J.: Cellular injury and carcinogenesis. Biochem. J. 91, 35-42 (1964).

71. MARGISON, G.P., CAPPS, M.J., O'CONNOR, P.J., CRAIG, A.W.: Loss of 7-methylguanine from rat liver DNA after methylation in vivo with methylmethanesulfonate or dimethylnitrosamine. Chem.-Biol. Interact. 6, 119-124 (1973).

72. MARGISON, G.P., O'CONNOR, P.J.: Biological implications of the instability of the N-glycosidic bond of 3-methyldeoxyadenosine in DNA. Biochim. Biophys. Acta 331, 349-356 (1973).

73. MARQUARDT, H., ZIMMERMANN, F.-K., SCHWEIER, R.: Die Wirkung krebsauslösender Nitrosamine und Nitrosamide auf das Adenin 6-45-Rückmutationssystem von Saccharomyces cerevisiae. Z. Vererbungslehre 95, 82-96 (1964).

74. MARQUARDT, H., STERNBERG, St., PHILIPS, F.: 7,12-dimethylbenz (α) anthracene and hepatic neoplasia in regenerating rat liver. Chem. Biol. Interact. 2, 401-403 (1970).

75. McELHONE, M.J., O'CONNOR, P.J., CRAIG, A.W.: The stability of rat liver ribonucleic acid in vivo after methylation with methyl methanesulfonate or dimethylnitrosamine. Biochem. J. 125, 821-827 (1971).

76. McILVAINE, T.C.: A buffer solution for colorimetric comparison. J. Biol. Chem. 49, 183-186 (1921).

77. MILLER, C., LAWLEY, P.D., SHAH, S.A.: Cellular reactions of O6-methylguanine, a product of some alkylating carcinogens. Biochem. J. 136, 387-393 (1973).

78. MILLER, J.A., MILLER, E.C.: A survey of molecular aspects of chemical carcinogenesis. Lab. Invest. 15, 217-237 (1966).

79. MILLER, E.C., MILLER, J.A.: The mutagenicity of chemical carcinogens; correlations, problems, and interpretations. In: A. Hollaender, (Ed.): Chemical Mutagens - Principles and Methods for Their Detection, Vol. 1, p.83-119. New York: Plenum Press (1971).

80. NAGATA, C.A., IMAMURA, H., SAITO, K., FUKUI, K.: Changes of Π-electron distribution of deoxyribonucleic acid after alkylation and their possible relation to the biological effect. Gann 54, 109-117 (1963).

81. OBERBARNSCHEIDT, J.: 7-Äthylguaningehalt in Rattenleber-nukleinsäuren als Funktion der Zeit nach Applikation von Diäthyl-(^{14}C)-nitrosamin.
Diplomarbeit, Universität Tübingen (1971).

82. O'CONNOR, P.J., CAPPS, M.J., CRAIG, A.W., LAWLEY, P.D., SHAH, S.A.: Differences in the patterns of methylation in rat liver ribosomal ribonucleic acid after reaction in vivo with methyl methanesulfonate and NN-dimethyl-nitrosamine.
Biochem. J. 129, 519-528 (1972).

83. O'CONNOR, P.J., CAPPS, M.J., CRAIG, A.W.: Comparative studies of the hepatocarcinogen NN-dimethylnitrosamine in vivo: Reaction sites in rat liver DNA and the significance of their relative stabilities.
Brit. J. Cancer 27, 153-166 (1973).

84. OLSON, A.O., BAIRD, K.M.: Single-strand breaks in Escherichia coli DNA caused by treatment with nitrosoguanidine.
Biochim. Biophys. Acta 179, 513-514 (1969).

85. PITOT, H.C., HEIDELBERGER, C.: Metabolic regulatory circuits and carcinogenesis.
Cancer Res. 23, 1694-1700 (1963).

86. PITOT, H.C.: Altered template stability: The molecular mask of malignancy.
Perspectives Biol. Med. 8, 50-70 (1964).

87. RAJEWSKY, M.F.: Temporal and metabolic aspects of tumor cell cycles. In: R.L. Clark, (Ed.): Oncology 1970, Vol. I, p.394-402. Chicago: Year Book Medical Publishers (1971).

88. RAJEWSKY, M.F., FABRICIUS, E., HÜLSER, D.F.: Synchronisation in vivo: Temporary inhibition of DNA synthesis in the rat embryo with hydroxyurea.
Exp. Cell Res. 66, 489-492 (1971).

89. RAJEWSKY, M.F.: Proliferative parameters of mammalian cell systems and their role in tumor growth and carcinogenesis.
Z. Krebsforsch. 78, 12-30 (1972).

90. ROBERTS, J.J., CRATHORN, A.R., BRENT, T.P.: Repair of alkylated DNA in mammalian cells.
Nature 218, 970-972 (1968).

91. SACHS, L.: An analysis of the mechanism of neoplastic cell transformation by polyoma virus, hydrocarbons, and x-irradiation. In: Current Topics in Developm. Biol., Vol. 2, p.129-150. New York-London: Academic Press (1967).

92. SANES, J.R., OKUN, L.M.: Induction of DNA synthesis in cultured neurons by ultraviolet light or methyl methane sulfonate.
J. Cell Biology 53, 587-590 (1972).

93. SEARLE, C.E., JONES, E.L.: Tumours of the nervous system in mice treated neonatally with N-ethyl-N-nitrosourea.
Nature 240, 559-560 (1972).

94. SCHOENTHAL, R.: Carcinogenic action of diazomethane and of nitroso-N-methyl urethane.
Nature 188, 420-421 (1960).

95. STICH, H.F., SAN, R.H.C., KAWAZOE, Y.: Increased sensitivity of Xeroderma pigmentosum cells to some chemical carcinogens and mutagens.
Mutat. Res. 17, 127-137 (1973).

96. STRAUSS, B.S.: DNA repair mechanism and their relation to mutation and recombination.
Microbiology 44, 1-85 (1967).

97. SWANN, P.F., MAGEE, P.N.: Nitrosamine-induced carcinogenesis. The alkylation of nucleic acids of the rat by N-methyl-N-nitrosourea, dimethylnitrosamine, dimethyl sulfate, and methyl methanesulfonate.
Biochem. J. 110, 39-47 (1968).

98. SWANN, P.F., MAGEE, P.N.: Nitrosamine-induced carcinogenesis. The alkylation af N-7 of guanine of nucleic acids of the rat by diethylnitrosamine, N-ethyl-N-nitrosourea and ethyl methanesulfonate.
Biochem. J. 125, 841-847 (1971).

99. TEMIN, H.M.: Studies on carcinogenesis by avian sarcoma viruses. V. Requirement for new DNA synthesis and for cell division.
J. Cell Physiol. 69, 53-63 (1967).

100. TEMIN, H.M.: The protovirus hypothesis: Speculations on the significance of RNA-directed DNA synthesis for normal development and for carcinogenesis.
J. Nat. Cancer Inst. 46, III-VII (1971).

101. TONG-MAN ONG, de SERRES, F.J.: Mutagenicity of chemical carcinogens in neurospora crassa.
Cancer Res. 32, 1890-1893 (1972).

102. VELEMINSKY, J., ZADRAZIL, S., POKORNY, V., GICHNER, T., SVACHULOVA, J.: Repair of single-strand breaks and fate of N7-methylguanine in DNA during the recovery from genetical damage induced by N-methyl-N-nitrosourea in barley seeds.
Mutat. Res. 17, 49-58 (1973).

103. WARWICK, G.P.: The covalent binding of metabolites of tritiated 2-methyl-4-dimethyl-amino-azobenzene to rat liver nucleic acids and proteins and the carcinogenicity of the unlabelled compound in partially hepatectomised rats.
Europ. J. Cancer 3, 227-233 (1967).

104. WARWICK, G.P.: Effect of the cell cycle on carcinogenesis.
Fed. Proc. 30, 1760-1765 (1971).

105. WECHSLER, W., KLEIHUES, P., MATSUMOTO, S., ZÜLCH, K.J., IVANKOVIC, S., PREUSSMANN, R., DRUCKREY, H.: Pathology of experimental neurogenic tumors chemically induced during prenatal and postnatal life.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 159, 360-408 (1969).

106. WEINSTEIN, J.B.: A possible role of transfer-RNA in the mechanism of carcinogenesis.
Cancer Res. 28, 1797-1915 (1968).

107. YOUNG, C.W., HODAS, S.: Hydroxyurea: Inhibitory effect on DNA metabolism.
Science 146, 1172-1174 (1964).

7. Lebenslauf

Am 8. Januar 1945 wurde ich als viertes Kind des Chemikers Dr. Erich Goth und seiner Frau Gertrud in Wuppertal geboren. Nach dem Besuch der Volksschule von 1951-1955 wechselte ich auf das Neusprachliche Gymnasium Helmholtz-Straße, wo ich im März 1964 das Abitur bestand. Im Sommersemester 1964 begann ich in Tübingen mit dem Studium der Biochemie. Nachdem ich im Februar 1970 die mündliche Diplomprüfung abgelegt und am Max-Planck-Institut für Virusforschung eine Diplomarbeit angefertigt hatte, erhielt ich im Frühjahr 1971 das Diplom in Biochemie. Von Mai 1971 bis Februar 1974 arbeitete ich an der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Abteilung für physikalische Biologie, Tübingen, unter der Anleitung von Dr. Manfred Rajewsky.

Meine akademischen Lehrer waren

in Chemie und Biochemie:

- E. Bayer
- W. Frank
- M. Hanack
- G. Kortüm
- E. Müller
- F. Schneider
- G. Weitzel

in Biologie und Physiologie:

- H. Friedrich-Freksa
- P. Pauschinger
- M. Rajewsky
- W. Seyffert
- H. Zähner